

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SCHRELL, Andreas
Gleiss & Große
Maybachstrasse 6A
D-70469 Stuttgart
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

21 August 2001 (21.08.01)

Applicant's or agent's file reference

23889 WO

International application No.

PCT/EP00/09356

IMPORTANT NOTIFICATION

International filing date (day/month/year)

26 September 2000 (26.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:



the applicant



the inventor



the agent



the common representative

Name and Address

ROCHE DIAGNOSTICS GMBH
68298 Mannheim
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:



the person



the name



the address



the nationality



the residence

Name and Address

CYTONET GMBH & CO. KG
Albert-Ludwig-Grimm-Strasse 20
69469 Weinheim
Germany

State of Nationality

DE

State of Residence

DE

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

Assignment.

4. A copy of this notification has been sent to:



the receiving Office



the designated Offices concerned



the International Searching Authority



the elected Offices concerned



the International Preliminary Examining Authority



other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

KÖNIG Elisabeth

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

SCHRELL, Andreas
Maybach Strasse
70469 Stuttgart
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year)

21 June 2001 (21.06.01)

Applicant's or agent's file reference

5298/00/WO-Hil

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.

PCT/EP00/09356

International filing date (day/month/year)

26 September 2000 (26.09.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☐

the applicant

☐

the inventor

☒

the agent

☐

the common representative

Name and Address

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

Facsimile No.

Teleprinter No.

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒

the person

☐

the name

☒

the address

☐

the nationality

☐

the residence

Name and Address

SCHRELL, Andreas
Maybach Strasse
70469 Stuttgart
Germany

State of Nationality

State of Residence

Telephone No.

0711/81 45 55

Facsimile No.

0711/81 30 32

Teleprinter No.

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒

the receiving Office

☒

the International Searching Authority

☒

the International Preliminary Examining Authority

☐

the designated Offices concerned

☒

the elected Offices concerned

☐

other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Juan Cruz

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)

21 June 2001 (21.06.01)

International application No.

PCT/EP00/09356

Applicant's or agent's file reference

5298/00/WO-Hil

International filing date (day/month/year)

26 September 2000 (26.09.00)

Priority date (day/month/year)

28 September 1999 (28.09.99)

Applicant

GUNZER, Florian et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

25 April 2001 (25.04.01)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Juan Cruz

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

Modified
Annex AU.IV

VERIFICATION OF TRANSLATION

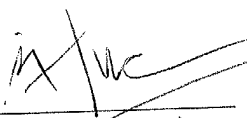
I, Elisabeth A. Lucas

of Lawyers' & Merchants' Translation Bureau, Inc.
11 Broadway, Suite 466, New York, NY 10004

declare as follows:

1. That I am well acquainted with both the English and German languages, and
 2. That the attached document is a true and correct translation made by me to the best of my knowledge and belief of:-
- (b) The Amendments made to the specification of International Application
No.PCT/EP00/09356

3/8/02
(Date)


(Signature of Translator)

(No witness required)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 23889 WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP00/09356	International filing date (day/month/year) 26 September 2000 (26.09.00)	Priority date (day/month/year) 28 September 1999 (28.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q 1/68		
Applicant CYTONET GMBH & CO. KG		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 6 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 25 April 2001 (25.04.01)	Date of completion of this report 18 December 2001 (18.12.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:
pages 2,4-6,8-14,16-18, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages 1,3,7,15, filed with the letter of 03 December 2001 (03.12.2001)
- ☒ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages 1-17, filed with the letter of 03 December 2001 (03.12.2001)
- ☒ the drawings:
pages 1/2,2/2, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages 17,18, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP 00/09356

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-17	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The oligonucleotides according to SEQ ID NOs. 1-4 are not disclosed in the known prior art. The same applies to the hybridisation probes according to Claims 11 and 12. Claims 1-17 are therefore novel within the meaning of PCT Article 33(2).

2. Closest prior art:

GANNON V P J et al.: "Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* on ground beef using the polymerase chain reaction", APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 58, No. 12, December 1992 (1992-12), pages 3809-3815

The invention differs from the above in that it involves the generation of amplification products from stxA1 - stxA2 sequences which can identify and distinguish both human pathogenic and porcine pathogenic stx2 isoforms in a single detection reaction. This is possible owing to the selection of primer pairs as per Claim 1 in conjunction with suitable hybridisation probes (defined in Claims 11 and 12), in particular by way of melting point curve analysis.

These primers and hybridisation probes, as well as the methods which use them and kits which contain them, cannot be derived in an obvious way from any of the documents cited in the international search report. Claims 1-17 therefore meet the requirement of PCT Article 33(3).

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 27 DEC 2001

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 23889 WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09356	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder CYTONET GMBH & CO. KG et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 18.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wieser, M Tel. Nr. +49 89 2399 8434 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

2,4-6,8-14, ursprüngliche Fassung
16-18

1,3,7,15 eingegangen am 04/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Patentansprüche, Nr.:

1-17 eingegangen am 04/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

17,18, eingereicht mit dem Antrag.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

INTERNATIONALEN VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09356

- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Punkt V

1. Die Oligonukleotide gemäß SEQ ID NO 1-4 werden im bekannten Stand der Technik nicht offenbart. Dasselbe trifft auch auf die Hybridisationssonden gemäß Ansprüchen 11 und 12 zu. Die Ansprüche 1-17 sind somit neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT.
2. Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich vom nächsten Stand der Technik

GANNON V P J ET AL.: 'Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli on ground beef using the polymerase chain reaction' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 58, Nr. 12, Dezember 1992 (1992-12), Seiten 3809-3815

dadurch, daß Amplifikationsprodukte aus stxA1- stxA2-Sequenzen erzeugt werden, mit denen sowohl Human-pathogene als auch Schweine-pathogene stx2 Isoformen durch eine einzige Nachweisreaktion differenziert zu identifizieren sind. Dies gelingt durch die Auswahl der erfindungsgemäßen Primerpaare gemäß Anspruch 1 in Verbindung mit geeigneten Hybridisationssonden, die der Gegenstand der Ansprüche 11 und 12 sind, insbesondere mittels Schmelzkurvenanalyse.

Solche Primer oder Hybridisationssonden, Methoden die sie verwenden oder Kits die sie enthalten, können nicht in naheliegender Weise aus den im Internationalen Recherchenbericht angeführten Dokumenten abgeleitet werden. Die Ansprüche 1-17 entsprechen den Erfordernissen von Artikel 33(3) PCT.

Cytonet GmbH & Co. KG

PCT/EP00/09356

Multiplex-PCR zum Nachweis von EHEC-Infektionen

Die vorliegende Erfindung entstammt dem diagnostischen Gebiet des Nachweises von hämorrhagischen Durchfallerkrankungen.

Entero-hämorrhagische E.coli-Erreger (EHEC) sind gefährliche Erreger von Durchfallerkrankungen, die sowohl durch Nahrungsmittel als auch durch Schmierinfektionen übertragen werden können. Entero-hämorrhagische E.coli Keime sind in der Lage, hochpotente Zytotoxine zu bilden. Dabei handelt es sich um Proteine, die grosse Ähnlichkeit mit dem Shiga-Toxin von Shigella dysenteriae Typ 1 besitzen und deshalb Shiga-Toxin 1 und Shiga-Toxin 2 genannt werden. Die dafür codierenden Gene für die jeweiligen Untereinheiten A und B werden mit stxA1 (GenBank-Nummer M19473) und stxB1 (GenBank-Nummer M19473) bzw. stxA2 (GenBank-Nummer X07865) und stxB2 (GenBank-Nummer X07865) bezeichnet. Pathogene E.coli Stämme können entweder eines der beiden Shiga-Toxin-Gene oder aber auch beide enthalten. Darüber hinaus können die Erreger weitere assoziierte Virulenz-Faktoren wie EHEC-Intimin, EHEC-Hämolysin, EHEC-Katalase, EHEC-Serinprotease sowie EHEC-Enterotoxin aufweisen.

Der diagnostische Nachweis von EHEC ist wegen der Übertragungswege und der mit etwa 10^2 - 10^3 Keimen geringen Infektionsdosis nicht nur bei akut Erkrankten wichtig, sondern auch, um eventuelle Ausscheider zu identifizieren oder andere Infektionsquellen ausfindig zu machen. Nach dem Stand der Technik werden EHEC-Infektionen auf mikrobiologischem Wege mit Sorbit McConkey Selektivagarplatten oder mit Hilfe von Toxin-ELISAs nachgewiesen. Darüber hinaus existieren PCR-Nachweismethoden, mit deren Hilfe Shiga-Toxin-Gensequenzen nachgewiesen werden können (z.B. Chen et al., Applied and Environmental Microbiology Vol. 64 No. 11, S. 4210-4116, 1998; Gannon et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 58 No. 12, S. 3809-3815, 1992; Pierard et al., Journal of Clinical Microbiology Vol. 36, No.11, S. 3317-3322,). In der Routinediagnostik werden gegenwärtig jedoch ausschließlich Verfahren angewendet, welche die für die B Untereinheit kodierende Sequenz amplifizieren.

Diese Aufgabe wird durch eine Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen gelöst, bei dem gleichzeitig stxA1 und stxA2 Sequenzen identifiziert werden können, die sowohl von Human-pathogenen als auch von Schweine-pathogenen Erregern stammen.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren, bei dem in einer Multiplex-Amplifikations-Reaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen sowohl stxA1- als auch stxA2-Sequenzen amplifiziert werden, welches insbesondere dadurch gekennzeichnet ist, dass sowohl Human-pathogene stxA2 Isoformen als auch Schweine-pathogene stxA2_e-Isoformen amplifiziert werden. Dabei bezieht sich der Begriff „Multiplex-Amplifikations-Reaktion“ auf PCR-Verfahren, bei denen mindestens zwei verschiedene Primer-Paare verwendet werden, von denen ein Primer-Paar zur Amplifikation von stx1-Sequenzen und ein zweites Primer-Paar zur Amplifikation von stx2-Sequenzen verwendet wird. Der Begriff „Schweine-Pathogen“ wird im Rahmen dieser Anmeldung für Erreger verwendet, die ein Shiga-Toxin Gen stx2_e (Weinstein et al., J.Bacteriol. 170, S. 4223-4230, 1988), GenBank-Nummer: M21534) aufweisen und primär beim Schwein die Ödemkrankheit auslösen, aber auch beim Menschen zu Durchfallerkrankungen und extraintestinalen Krankheitsmanifestationen führen können.

Besonders geeignet zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens haben sich Primer einer Länge von 17-25 Nukleotiden erwiesen, deren Sequenzen entweder identisch mit einer Sequenz gemäss SEQ ID NO 1-4 ist, deren Sequenzen kontinuierliche Teilsequenzen einer der Sequenzen gemäss SEQ ID NO 1-4 darstellen, oder bei denen eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 eine kontinuierliche Teilsequenz des Primers bildet. Die Verwendung von einem, bevorzugt mehrerer, besonders bevorzugt aller, erfindungsgemässen Primer zum Nachweis von EHEC-Infektionen ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Als vorteilhaft haben sich somit Multiplex-Amplifikations-Reaktionen zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen erwiesen, bei denen entweder ein, mehrere oder alle erfindungsgemässen Primer verwendet werden.

von der Zahl der durchlaufenen Reaktionszyklen ermittelt werden können. Dies geschieht in der Regel dadurch, dass aufgrund der Reaktions- und Temperaturbedingungen während des notwendigen Annealings der Amplifikationsprimer an die nachzuweisende Nukleinsäure auch die Oligonukleotide des FRET-Paares an die Target-Nukleinsäure hybridisieren und bei geeigneter Anregung ein entsprechend messbares Fluoreszenzsignal emittiert wird. Aufgrund der erhaltenen Daten kann somit die Menge der ursprünglich eingesetzten Target-Nukleinsäure quantitativ bestimmt werden.

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion der Multiplex-Amplifikationsprodukte nach Beendigung der Amplifikationsreaktion, wobei nach Hybridisierung des FRET-Paares an die zu detektierende Target-Nukleinsäure die Temperatur im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse kontinuierlich erhöht wird. Gleichzeitig wird die in Abhängigkeit von der Temperatur emittierte Fluoreszenz gemessen und auf diese Weise eine Schmelztemperatur bestimmt, bei dem das eingesetzte FRET-Paar nicht mehr an die nachzuweisende Sequenz hybridisiert. Bei einem Auftreten von Mismatches zwischen dem eingesetzten FRET-Paar und dem Amplifikationsprodukt wird der Schmelzpunkt signifikant erniedrigt. Auf diese Weise können mit einem FRET-Paar verschiedene Target-Nukleinsäuren identifiziert werden, deren Sequenzen sich voneinander geringfügig durch eine oder wenige Punktmutationen unterscheiden.

Erfindungsgemäß wird dieses Prinzip in einer Multiplex-Amplifikationsreaktion zum Nachweis von EHEC Infektionen angewandt, bei der ein interner Standard eingesetzt wird, welcher sich von der stxA1 oder der stxA2 Wildtyp-Sequenz (GenBank-Nummer X07865) nur in ein oder zwei Punktmutationen unterscheidet. Somit können amplifizierte Target-Nukleinsäure und amplifizierter interner Standard mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse voneinander unterschieden werden.

Dabei wird der Standard vorzugsweise nur in geringen Mengen von etwa 100 Plasmidkopien ($1,7 \cdot 10^{-22}$ mol) eingesetzt, so dass ein positives Signal hinsichtlich der Amplifikation des internen Standards nicht nur anzeigt, dass die PCR im jeweiligen Ansatz nicht in irgendeiner Weise inhibiert worden ist, sondern auch eine Kontrolle hinsichtlich der Sensitivität der Reaktion darstellt.

Dabei konnten sämtliche humanen Isolate als stx positiv identifiziert werden, wobei in 18 Stämmen lediglich stx1, in 19 Stämmen lediglich stx2 und in 11 Stämmen beide Gene nachgewiesen wurden. Die drei Schweine-Isolate waren ebenfalls stx2-positiv.

Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Hybridisierungsproben gemäß SEQ ID NO 7 und 8 wurden bei verschiedenen Isolaten Unterschiede hinsichtlich der Schmelztemperaturen von stxA2 gemessen: Bei Amplifikaten aus 18 der 30 stxA2 enthaltenden humanen Isolate wurden für stxA2 Schmelztemperaturen von 71-72°C ermittelt. Diese Temperatur ist identisch mit dem auf Grund vorangegangener Experimente ermittelten T_m für klonierte stxA2 DNA aus Human-pathogenen Stämmen. Für die DNA der restlichen 12 stxA2 enthaltenden humanen Isolate sowie für die DNA aus den drei Schweine-pathogenen Stämmen, welche mit Sicherheit das stx_{2e} Allel enthalten, wurden Schmelztemperaturen von ca. 63°C ermittelt. Aus dem identischen T_m kann gefolgert werden, dass die 12 Human-pathogenen Isolate auf Schweine-pathogene EHEC Stämme zurückzuführen sind und vermutlich ebenfalls das stx_{2e} Allel enthalten. Diese Vermutung wurde durch Sequenzanalyse der PCR-Produkte aus den entsprechenden 12 Isolaten bestätigt.

Insgesamt zeigt dieses Beispiel, dass mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens sowohl Human-pathogene als auch Schweine-pathogene EHEC Erreger identifiziert werden können.

Beispiel 5: Spezifität – Vermeidung falsch positiver Ergebnisse

Spezifitätstests wurden an 32 in Tabelle 2 aufgelisteten stx-negativen Bakterienstämmen durchgeführt. Dazu wurde aus entsprechenden Übernachtskulturen DNA gemäß Beispiel 1 extrahiert. Anschließend wurde die isolierte DNA gemäß Beispiel 2 mithilfe des SybrGreen Modus auf die Präsenz von stxA1 und stxA2 untersucht. Das Ergebnis war immer eindeutig negativ. Als Inhibitionskontrolle wurde die DNA in einem parallelen Ansatz mit DNA des stx1 - und stx2 - positiven E. coli - Stammes EDL 933 vermischt und im gleichen Lauf auf stx1 und stx2 getestet, wobei ohne Ausnahme eindeutig positive Signale erhalten wurden.

Cytonet GmbH & Co. KG**PCT/EP00/09356****Ansprüche**

1. Primer einer Länge von 17 bis 25 Nukleotiden, deren Sequenzen identisch mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 sind, oder deren Sequenzen Teilsequenzen einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO 1-4 darstellen, oder bei denen eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 eine kontinuierliche Teilsequenz des Primers bildet.
2. Multiplex Amplifikationsreaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen, bei der sowohl stxA1 als auch stxA2 Sequenzen sowohl Human-pathogener als auch Schweine-pathogener stx2 Isoformen amplifiziert werden, dadurch gekennzeichnet, dass alle Primer gemäß Anspruch 1 verwendet werden.
3. Verwendung von Primern gemäß Anspruch 1 zum Nachweis einer EHEC Infektion.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt der Amplifikationsreaktion zusätzlich durch Hybridisierung detektiert wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Hybridisations-Sonde eine Sequenz aufweist, die identisch oder komplementär zu der Region des stxA1 Gens bzw. des stxA2 Gens ist, die für das enzymatisch aktive Zentrum der kodierten Polypeptidkette kodiert.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2-5, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe von Fluoreszenzdetektion nachgewiesen wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe einer bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoreszierenden Verbindung detektiert wird.
8. Verfahren gemäß Anspruch 4-6, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nachgewiesen wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem ein interner Standard eingesetzt wird, welcher sich von der stxA1 oder der stxA2 Sequenz nur in ein oder zwei Punktmutationen unterscheidet, dadurch gekennzeichnet, dass amplifizierte Target-DNA und interner Standard mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse voneinander unterschieden werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, das Human-pathogenes stxA2 und Schweine-pathogenes stxA2_e mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse unterschieden werden.
11. Hybridisations-Sonden mit Sequenzen oder Teilsequenzen gemäß SEQ ID NO 5-7.
12. Hybridisations-Sonde mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO 8.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass Hybridisations-Sonden mit Sequenzen gemäß Anspruch 11 oder 12 verwendet werden.
14. Verwendung von Hybridisations-Sonden gemäß Anspruch 11 oder 12 zur Bestimmung von Schmelzkurven.
15. Kit zum Nachweis klinisch relevanter EHEC-Infektionen, enthaltend Primer gemäß Anspruch 1.
16. Kit gemäß Anspruch 15 enthaltend Hybridisations-Sonden.
17. Kit gemäß Anspruch 15 oder 16, enthaltend Reagenzien zur Amplifikation zusätzlicher Pathogenitätsfaktoren.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

REC'D 27 DEC 2001

WIPO PCT

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 23889 WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09356	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder CYTONET GMBH & CO. KG et al.		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 18.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wieser, M Tel. Nr. +49 89 2399 8434 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

2,4-6,8-14, ursprüngliche Fassung
16-18

1,3,7,15 eingegangen am 04/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Patentansprüche, Nr.:

1-17 eingegangen am 04/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

17,18, eingereicht mit dem Antrag.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

INTERNATIONALEN VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09356

- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Punkt V

1. Die Oligonukleotide gemäß SEQ ID NO 1-4 werden im bekannten Stand der Technik nicht offenbart. Dasselbe trifft auch auf die Hybridisationssonden gemäß Ansprüchen 11 und 12 zu. Die Ansprüche 1-17 sind somit neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT.
2. Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich vom nächsten Stand der Technik

GANNON V P J ET AL.: 'Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli on ground beef using the polymerase chain reaction' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 58, Nr. 12, Dezember 1992 (1992-12), Seiten 3809-3815

dadurch, daß Amplifikationsprodukte aus stxA1- stxA2-Sequenzen erzeugt werden, mit denen sowohl Human-pathogene als auch Schweine-pathogene stx2 Isoformen durch eine einzige Nachweisreaktion differenziert zu identifizieren sind. Dies gelingt durch die Auswahl der erfindungsgemäßen Primerpaare gemäß Anspruch 1 in Verbindung mit geeigneten Hybridisationssonden, die der Gegenstand der Ansprüche 11 und 12 sind, insbesondere mittels Schmelzkurvenanalyse.

Solche Primer oder Hybridisationssonden, Methoden die sie verwenden oder Kits die sie enthalten, können nicht in naheliegender Weise aus den im Internationalen Recherchenbericht angeführten Dokumenten abgeleitet werden. Die Ansprüche 1-17 entsprechen den Erfordernissen von Artikel 33(3) PCT.

Cytonet GmbH & Co. KG

PCT/EP00/09356

Multiplex-PCR zum Nachweis von EHEC-Infektionen

Die vorliegende Erfindung entstammt dem diagnostischen Gebiet des Nachweises von hämorrhagischen Durchfallerkrankungen.

Entero-hämorrhagische E.coli-Erreger (EHEC) sind gefährliche Erreger von Durchfallerkrankungen, die sowohl durch Nahrungsmittel als auch durch Schmierinfektionen übertragen werden können. Entero-hämorrhagische E.coli Keime sind in der Lage, hochpotente Zytotoxine zu bilden. Dabei handelt es sich um Proteine, die grosse Ähnlichkeit mit dem Shiga-Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ 1 besitzen und deshalb Shiga-Toxin 1 und Shiga-Toxin 2 genannt werden. Die dafür codierenden Gene für die jeweiligen Untereinheiten A und B werden mit stxA1 (GenBank-Nummer M19473) und stxB1 (GenBank-Nummer M19473) bzw. stxA2 (GenBank-Nummer X07865) und stxB2 (GenBank-Nummer X07865) bezeichnet. Pathogene E.coli Stämme können entweder eines der beiden Shiga-Toxin-Gene oder aber auch beide enthalten. Darüber hinaus können die Erreger weitere assoziierte Virulenz-Faktoren wie EHEC-Intimin, EHEC-Hämolysin, EHEC-Katalase, EHEC-Serinprotease sowie EHEC-Enterotoxin aufweisen.

Der diagnostische Nachweis von EHEC ist wegen der Übertragungswege und der mit etwa 10^2 - 10^3 Keimen geringen Infektionsdosis nicht nur bei akut Erkrankten wichtig, sondern auch, um eventuelle Ausscheider zu identifizieren oder andere Infektionsquellen ausfindig zu machen. Nach dem Stand der Technik werden EHEC-Infektionen auf mikrobiologischem Wege mit Sorbit McConkey Selektivagarplatten oder mit Hilfe von Toxin-ELISAs nachgewiesen. Darüber hinaus existieren PCR-Nachweismethoden, mit deren Hilfe Shiga-Toxin-Gensequenzen nachgewiesen werden können (z.B. Chen et al., Applied and Environmental Microbiology Vol. 64 No. 11, S. 4210-4116, 1998; Gannon et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 58 No. 12, S. 3809-3815, 1992; Pierard et al., Journal of Clinical Microbiology Vol. 36, No.11, S. 3317-3322,). In der Routinediagnostik werden gegenwärtig jedoch ausschließlich Verfahren angewendet, welche die für die B Untereinheit kodierende Sequenz amplifizieren.

Diese Aufgabe wird durch eine Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen gelöst, bei dem gleichzeitig stxA1 und stxA2 Sequenzen identifiziert werden können, die sowohl von Human-pathogenen als auch von Schweine-pathogenen Erregern stammen.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren, bei dem in einer Multiplex-Amplifikations-Reaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen sowohl stxA1- als auch stxA2-Sequenzen amplifiziert werden, welches insbesondere dadurch gekennzeichnet ist, dass sowohl Human-pathogene stxA2 Isoformen als auch Schweine-pathogene stxA2_e-Isoformen amplifiziert werden. Dabei bezieht sich der Begriff „Multiplex-Amplifikations-Reaktion“ auf PCR-Verfahren, bei denen mindestens zwei verschiedene Primer-Paare verwendet werden, von denen ein Primer-Paar zur Amplifikation von stx1-Sequenzen und ein zweites Primer-Paar zur Amplifikation von stx2-Sequenzen verwendet wird. Der Begriff „Schweine-Pathogen“ wird im Rahmen dieser Anmeldung für Erreger verwendet, die ein Shiga-Toxin Gen stx2_e (Weinstein et al., J.Bacteriol. 170, S. 4223-4230, 1988), GenBank-Nummer: M21534) aufweisen und primär beim Schwein die Ödemkrankheit auslösen, aber auch beim Menschen zu Durchfallerkrankungen und extraintestinalen Krankheitsmanifestationen führen können.

Besonders geeignet zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens haben sich Primer einer Länge von 17-25 Nukleotiden erwiesen, deren Sequenzen entweder identisch mit einer Sequenz gemäss SEQ ID NO 1-4 ist, deren Sequenzen kontinuierliche Teilsequenzen einer der Sequenzen gemäss SEQ ID NO 1-4 darstellen, oder bei denen eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 eine kontinuierliche Teilsequenz des Primers bildet. Die Verwendung von einem, bevorzugt mehrerer, besonders bevorzugt aller, erfindungsgemässen Primer zum Nachweis von EHEC-Infektionen ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Als vorteilhaft haben sich somit Multiplex-Amplifikations-Reaktionen zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen erwiesen, bei denen entweder ein, mehrere oder alle erfindungsgemässen Primer verwendet werden.

von der Zahl der durchlaufenen Reaktionszyklen ermittelt werden können. Dies geschieht in der Regel dadurch, dass aufgrund der Reaktions- und Temperaturbedingungen während des notwendigen Annealings der Amplifikationsprimer an die nachzuweisende Nukleinsäure auch die Oligonukleotide des FRET-Paares an die Target-Nukleinsäure hybridisieren und bei geeigneter Anregung ein entsprechend messbares Fluoreszenzsignal emittiert wird. Aufgrund der erhaltenen Daten kann somit die Menge der ursprünglich eingesetzten Target-Nukleinsäure quantitativ bestimmt werden.

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion der Multiplex-Amplifikationsprodukte nach Beendigung der Amplifikationsreaktion, wobei nach Hybridisierung des FRET-Paares an die zu detektierende Target-Nukleinsäure die Temperatur im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse kontinuierlich erhöht wird. Gleichzeitig wird die in Abhängigkeit von der Temperatur emittierte Fluoreszenz gemessen und auf diese Weise eine Schmelztemperatur bestimmt, bei dem das eingesetzte FRET-Paar nicht mehr an die nachzuweisende Sequenz hybridisiert. Bei einem Auftreten von Mismatches zwischen dem eingesetzten FRET-Paar und dem Amplifikationsprodukt wird der Schmelzpunkt signifikant erniedrigt. Auf diese Weise können mit einem FRET-Paar verschiedene Target-Nukleinsäuren identifiziert werden, deren Sequenzen sich voneinander geringfügig durch eine oder wenige Punktmutationen unterscheiden.

Erfindungsgemäß wird dieses Prinzip in einer Multiplex-Amplifikationsreaktion zum Nachweis von EHEC Infektionen angewandt, bei der ein interner Standard eingesetzt wird, welcher sich von der stxA1 oder der stxA2 Wildtyp-Sequenz (GenBank-Nummer X07865) nur in ein oder zwei Punktmutationen unterscheidet. Somit können amplifizierte Target-Nukleinsäure und amplifizierter interner Standard mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse voneinander unterschieden werden.

Dabei wird der Standard vorzugsweise nur in geringen Mengen von etwa 100 Plasmidkopien ($1,7 \cdot 10^{-22}$ mol) eingesetzt, so dass ein positives Signal hinsichtlich der Amplifikation des internen Standards nicht nur anzeigt, dass die PCR im jeweiligen Ansatz nicht in irgendeiner Weise inhibiert worden ist, sondern auch eine Kontrolle hinsichtlich der Sensitivität der Reaktion darstellt.

Dabei konnten sämtliche humanen Isolate als stx positiv identifiziert werden, wobei in 18 Stämmen lediglich stx1, in 19 Stämmen lediglich stx2 und in 11 Stämmen beide Gene nachgewiesen wurden. Die drei Schweine-Isolate waren ebenfalls stx2-positiv.

Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Hybridisierungsproben gemäß SEQ ID NO 7 und 8 wurden bei verschiedenen Isolaten Unterschiede hinsichtlich der Schmelztemperaturen von stxA2 gemessen: Bei Amplifikaten aus 18 der 30 stxA2 enthaltenden humanen Isolate wurden für stxA2 Schmelztemperaturen von 71-72°C ermittelt. Diese Temperatur ist identisch mit dem auf Grund vorangegangener Experimente ermittelten T_m für klonierte stxA2 DNA aus Human-pathogenen Stämmen. Für die DNA der restlichen 12 stxA2 enthaltenden humanen Isolate sowie für die DNA aus den drei Schweine-pathogenen Stämmen, welche mit Sicherheit das stx_{2e} Allel enthalten, wurden Schmelztemperaturen von ca. 63°C ermittelt. Aus dem identischen T_m kann gefolgert werden, dass die 12 Human-pathogenen Isolate auf Schweine-pathogene EHEC Stämme zurückzuführen sind und vermutlich ebenfalls das stx_{2e} Allel enthalten. Diese Vermutung wurde durch Sequenzanalyse der PCR-Produkte aus den entsprechenden 12 Isolaten bestätigt.

Insgesamt zeigt dieses Beispiel, dass mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens sowohl Human-pathogene als auch Schweine-pathogene EHEC Erreger identifiziert werden können.

Beispiel 5: Spezifität – Vermeidung falsch positiver Ergebnisse

Spezifitätstests wurden an 32 in Tabelle 2 aufgelisteten stx-negativen Bakterienstämmen durchgeführt. Dazu wurde aus entsprechenden Übernachtskulturen DNA gemäß Beispiel 1 extrahiert. Anschließend wurde die isolierte DNA gemäß Beispiel 2 mithilfe des SybrGreen Modus auf die Präsenz von stxA1 und stxA2 untersucht. Das Ergebnis war immer eindeutig negativ. Als Inhibitionskontrolle wurde die DNA in einem parallelen Ansatz mit DNA des stx1 - und stx2 - positiven E. coli - Stammes EDL 933 vermischt und im gleichen Lauf auf stx1 und stx2 getestet, wobei ohne Ausnahme eindeutig positive Signale erhalten wurden.

Cytonet GmbH & Co. KG**PCT/EP00/09356****Ansprüche**

1. Primer einer Länge von 17 bis 25 Nukleotiden, deren Sequenzen identisch mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 sind, oder deren Sequenzen Teilsequenzen einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO 1-4 darstellen, oder bei denen eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 eine kontinuierliche Teilsequenz des Primers bildet.
2. Multiplex Amplifikationsreaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen, bei der sowohl stxA1 als auch stxA2 Sequenzen sowohl Human-pathogener als auch Schweine-pathogener stx2 Isoformen amplifiziert werden, dadurch gekennzeichnet, dass alle Primer gemäß Anspruch 1 verwendet werden.
3. Verwendung von Primern gemäß Anspruch 1 zum Nachweis einer EHEC Infektion.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt der Amplifikationsreaktion zusätzlich durch Hybridisierung detektiert wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Hybridisations-Sonde eine Sequenz aufweist, die identisch oder komplementär zu der Region des stxA1 Gens bzw. des stxA2 Gens ist, die für das enzymatisch aktive Zentrum der kodierten Polypeptidkette kodiert.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2-5, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe von Fluoreszenzdetektion nachgewiesen wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe einer bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoreszierenden Verbindung detektiert wird.
8. Verfahren gemäß Anspruch 4-6, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nachgewiesen wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem ein interner Standard eingesetzt wird, welcher sich von der stxA1 oder der stxA2 Sequenz nur in ein oder zwei Punktmutationen unterscheidet, dadurch gekennzeichnet, dass amplifizierte Target-DNA und interner Standard mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse voneinander unterschieden werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, das Human-pathogenes stxA2 und Schweine-pathogenes stxA2_e mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse unterschieden werden.
11. Hybridisations-Sonden mit Sequenzen oder Teilsequenzen gemäß SEQ ID NO 5-7.
12. Hybridisations-Sonde mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO 8.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass Hybridisations-Sonden mit Sequenzen gemäß Anspruch 11 oder 12 verwendet werden.
14. Verwendung von Hybridisations-Sonden gemäß Anspruch 11 oder 12 zur Bestimmung von Schmelzkurven.
15. Kit zum Nachweis klinisch relevanter EHEC-Infektionen, enthaltend Primer gemäß Anspruch 1.
16. Kit gemäß Anspruch 15 enthaltend Hybridisations-Sonden.
17. Kit gemäß Anspruch 15 oder 16, enthaltend Reagenzien zur Amplifikation zusätzlicher Pathogenitätsfaktoren.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 23889 WO	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09356	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/09/2000	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 28/09/1999
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12Q1/68		
Anmelder CYTONET GMBH & CO. KG et al.		



1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 6 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 25/04/2001	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 18.12.2001
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Wieser, M Tel. Nr. +49 89 2399 8434 

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

2,4-6,8-14, ursprüngliche Fassung
16-18

1,3,7,15 eingegangen am 04/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Patentansprüche, Nr.:

1-17 eingegangen am 04/12/2001 mit Schreiben vom 03/12/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

Sequenzprotokoll in der Beschreibung, Seiten:

17,18, eingereicht mit dem Antrag.

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP00/09356

- ☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-17
	Nein: Ansprüche	

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

Punkt V

1. Die Oligonukleotide gemäß SEQ ID NO 1-4 werden im bekannten Stand der Technik nicht offenbart. Dasselbe trifft auch auf die Hybridisationssonden gemäß Ansprüchen 11 und 12 zu. Die Ansprüche 1-17 sind somit neu im Sinne von Artikel 33(2) PCT.
2. Die vorliegende Erfindung unterscheidet sich vom nächsten Stand der Technik

GANNON V P J ET AL.: 'Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli on ground beef using the polymerase chain reaction' APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 58, Nr. 12, Dezember 1992 (1992-12), Seiten 3809-3815

dadurch, daß Amplifikationsprodukte aus stxA1- stxA2-Sequenzen erzeugt werden, mit denen sowohl Human-pathogene als auch Schweine-pathogene stx2 Isoformen durch eine einzige Nachweisreaktion differenziert zu identifizieren sind. Dies gelingt durch die Auswahl der erfindungsgemäßen Primerpaare gemäß Anspruch 1 in Verbindung mit geeigneten Hybridisationssonden, die der Gegenstand der Ansprüche 11 und 12 sind, insbesondere mittels Schmelzkurvenanalyse.

Solche Primer oder Hybridisationssonden, Methoden die sie verwenden oder Kits die sie enthalten, können nicht in naheliegender Weise aus den im Internationalen Recherchenbericht angeführten Dokumenten abgeleitet werden. Die Ansprüche 1-17 entsprechen den Erfordernissen von Artikel 33(3) PCT.

Cytonet GmbH & Co. KG

PCT/EP00/09356

Multiplex-PCR zum Nachweis von EHEC-Infektionen

Die vorliegende Erfindung entstammt dem diagnostischen Gebiet des Nachweises von hämorrhagischen Durchfallerkrankungen.

Entero-hämorrhagische E.coli-Erreger (EHEC) sind gefährliche Erreger von Durchfallerkrankungen, die sowohl durch Nahrungsmittel als auch durch Schmierinfektionen übertragen werden können. Entero-hämorrhagische E.coli Keime sind in der Lage, hochpotente Zytotoxine zu bilden. Dabei handelt es sich um Proteine, die grosse Ähnlichkeit mit dem Shiga-Toxin von Shigella dysenteriae Typ 1 besitzen und deshalb Shiga-Toxin 1 und Shiga-Toxin 2 genannt werden. Die dafür codierenden Gene für die jeweiligen Untereinheiten A und B werden mit stxA1 (GenBank-Nummer M19473) und stxB1 (GenBank-Nummer M19473) bzw. stxA2 (GenBank-Nummer X07865) und stxB2 (GenBank-Nummer X07865) bezeichnet. Pathogene E.coli Stämme können entweder eines der beiden Shiga-Toxin-Gene oder aber auch beide enthalten. Darüber hinaus können die Erreger weitere assoziierte Virulenz-Faktoren wie EHEC-Intimin, EHEC-Hämolysin, EHEC-Katalase, EHEC-Serinprotease sowie EHEC-Enterotoxin aufweisen.

Der diagnostische Nachweis von EHEC ist wegen der Übertragungswege und der mit etwa 10^2 - 10^3 Keimen geringen Infektionsdosis nicht nur bei akut Erkrankten wichtig, sondern auch, um eventuelle Ausscheider zu identifizieren oder andere Infektionsquellen ausfindig zu machen. Nach dem Stand der Technik werden EHEC-Infektionen auf mikrobiologischem Wege mit Sorbit McConkey Selektivagarplatten oder mit Hilfe von Toxin-ELISAs nachgewiesen. Darüber hinaus existieren PCR-Nachweismethoden, mit deren Hilfe Shiga-Toxin-Gensequenzen nachgewiesen werden können (z.B. Chen et al., Applied and Environmental Microbiology Vol. 64 No. 11, S. 4210-4116, 1998; Gannon et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 58 No. 12, S. 3809-3815, 1992; Pierard et al., Journal of Clinical Microbiology Vol. 36, No.11, S. 3317-3322,). In der Routinediagnostik werden gegenwärtig jedoch ausschließlich Verfahren angewendet, welche die für die B Untereinheit kodierende Sequenz amplifizieren.

Diese Aufgabe wird durch eine Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen gelöst, bei dem gleichzeitig stxA1 und stxA2 Sequenzen identifiziert werden können, die sowohl von Human-pathogenen als auch von Schweine-pathogenen Erregern stammen.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren, bei dem in einer Multiplex-Amplifikations-Reaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen sowohl stxA1- als auch stxA2-Sequenzen amplifiziert werden, welches insbesondere dadurch gekennzeichnet ist, dass sowohl Human-pathogene stxA2 Isoformen als auch Schweine-pathogene stxA2_e-Isoformen amplifiziert werden. Dabei bezieht sich der Begriff „Multiplex-Amplifikations-Reaktion“ auf PCR-Verfahren, bei denen mindestens zwei verschiedene Primer-Paare verwendet werden, von denen ein Primer-Paar zur Amplifikation von stxA1-Sequenzen und ein zweites Primer-Paar zur Amplifikation von stxA2-Sequenzen verwendet wird. Der Begriff „Schweine-Pathogen“ wird im Rahmen dieser Anmeldung für Erreger verwendet, die ein Shiga-Toxin Gen stx2_e (Weinstein et al., J.Bacteriol. 170, S. 4223-4230, 1988), GenBank-Nummer: M21534) aufweisen und primär beim Schwein die Ödemkrankheit auslösen, aber auch beim Menschen zu Durchfallerkrankungen und extraintestinalen Krankheitsmanifestationen führen können.

Besonders geeignet zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens haben sich Primer einer Länge von 17-25 Nukleotiden erwiesen, deren Sequenzen entweder identisch mit einer Sequenz gemäss SEQ ID NO 1-4 ist, deren Sequenzen kontinuierliche Teilsequenzen einer der Sequenzen gemäss SEQ ID NO 1-4 darstellen, oder bei denen eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 eine kontinuierliche Teilsequenz des Primers bildet. Die Verwendung von einem, bevorzugt mehrerer, besonders bevorzugt aller, erfindungsgemässen Primer zum Nachweis von EHEC-Infektionen ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Als vorteilhaft haben sich somit Multiplex-Amplifikations-Reaktionen zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen erwiesen, bei denen entweder ein, mehrere oder alle erfindungsgemässen Primer verwendet werden.

von der Zahl der durchlaufenen Reaktionszyklen ermittelt werden können. Dies geschieht in der Regel dadurch, dass aufgrund der Reaktions- und Temperaturbedingungen während des notwendigen Annealings der Amplifikationsprimer an die nachzuweisende Nukleinsäure auch die Oligonukleotide des FRET-Paares an die Target-Nukleinsäure hybridisieren und bei geeigneter Anregung ein entsprechend messbares Fluoreszenzsignal emittiert wird. Aufgrund der erhaltenen Daten kann somit die Menge der ursprünglich eingesetzten Target-Nukleinsäure quantitativ bestimmt werden.

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion der Multiplex-Amplifikationsprodukte nach Beendigung der Amplifikationsreaktion, wobei nach Hybridisierung des FRET-Paares an die zu detektierende Target-Nukleinsäure die Temperatur im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse kontinuierlich erhöht wird. Gleichzeitig wird die in Abhängigkeit von der Temperatur emittierte Fluoreszenz gemessen und auf diese Weise eine Schmelztemperatur bestimmt, bei dem das eingesetzte FRET-Paar nicht mehr an die nachzuweisende Sequenz hybridisiert. Bei einem Auftreten von Mismatches zwischen dem eingesetzten FRET-Paar und dem Amplifikationsprodukt wird der Schmelzpunkt signifikant erniedrigt. Auf diese Weise können mit einem FRET-Paar verschiedene Target-Nukleinsäuren identifiziert werden, deren Sequenzen sich voneinander geringfügig durch eine oder wenige Punktmutationen unterscheiden.

Erfindungsgemäß wird dieses Prinzip in einer Multiplex-Amplifikationsreaktion zum Nachweis von EHEC Infektionen angewandt, bei der ein interner Standard eingesetzt wird, welcher sich von der stxA1 oder der stxA2 Wildtyp-Sequenz (GenBank-Nummer X07865) nur in ein oder zwei Punktmutationen unterscheidet. Somit können amplifizierte Target-Nukleinsäure und amplifizierter interner Standard mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse voneinander unterschieden werden.

Dabei wird der Standard vorzugsweise nur in geringen Mengen von etwa 100 Plasmidkopien ($1,7 \cdot 10^{-22}$ mol) eingesetzt, so dass ein positives Signal hinsichtlich der Amplifikation des internen Standards nicht nur anzeigt, dass die PCR im jeweiligen Ansatz nicht in irgendeiner Weise inhibiert worden ist, sondern auch eine Kontrolle hinsichtlich der Sensitivität der Reaktion darstellt.

Dabei konnten sämtliche humanen Isolate als stx positiv identifiziert werden, wobei in 18 Stämmen lediglich stx1, in 19 Stämmen lediglich stx2 und in 11 Stämmen beide Gene nachgewiesen wurden. Die drei Schweine-Isolate waren ebenfalls stx2-positiv.

Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Hybridisierungsproben gemäß SEQ ID NO 7 und 8 wurden bei verschiedenen Isolaten Unterschiede hinsichtlich der Schmelztemperaturen von stxA2 gemessen: Bei Amplifikaten aus 18 der 30 stxA2 enthaltenden humanen Isolate wurden für stxA2 Schmelztemperaturen von 71-72°C ermittelt. Diese Temperatur ist identisch mit dem auf Grund vorangegangener Experimente ermittelten T_m für klonierte stxA2 DNA aus Human-pathogenen Stämmen. Für die DNA der restlichen 12 stxA2 enthaltenden humanen Isolate sowie für die DNA aus den drei Schweine-pathogenen Stämmen, welche mit Sicherheit das stx_{2e} Allel enthalten, wurden Schmelztemperaturen von ca. 63°C ermittelt. Aus dem identischen T_m kann gefolgert werden, dass die 12 Human-pathogenen Isolate auf Schweine-pathogene EHEC Stämme zurückzuführen sind und vermutlich ebenfalls das stx_{2e} Allel enthalten. Diese Vermutung wurde durch Sequenzanalyse der PCR-Produkte aus den entsprechenden 12 Isolaten bestätigt.

Insgesamt zeigt dieses Beispiel, dass mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens sowohl Human-pathogene als auch Schweine-pathogene EHEC Erreger identifiziert werden können.

Beispiel 5: Spezifität – Vermeidung falsch positiver Ergebnisse

Spezifitätstests wurden an 32 in Tabelle 2 aufgelisteten stx-negativen Bakterienstämmen durchgeführt. Dazu wurde aus entsprechenden Übernachtskulturen DNA gemäß Beispiel 1 extrahiert. Anschließend wurde die isolierte DNA gemäß Beispiel 2 mithilfe des SybrGreen Modus auf die Präsenz von stxA1 und stxA2 untersucht. Das Ergebnis war immer eindeutig negativ. Als Inhibitionskontrolle wurde die DNA in einem parallelen Ansatz mit DNA des stx1 - und stx2 - positiven E. coli - Stammes EDL 933 vermischt und im gleichen Lauf auf stx1 und stx2 getestet, wobei ohne Ausnahme eindeutig positive Signale erhalten wurden.

Cytonet GmbH & Co. KG**PCT/EP00/09356****Ansprüche**

1. Primer einer Länge von 17 bis 25 Nukleotiden, deren Sequenzen identisch mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 sind, oder deren Sequenzen Teilsequenzen einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO 1-4 darstellen, oder bei denen eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 eine kontinuierliche Teilsequenz des Primers bildet.
2. Multiplex Amplifikationsreaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen, bei der sowohl stxA1 als auch stxA2 Sequenzen sowohl Human-pathogener als auch Schweine-pathogener stx2 Isoformen amplifiziert werden, dadurch gekennzeichnet, dass alle Primer gemäß Anspruch 1 verwendet werden.
3. Verwendung von Primern gemäß Anspruch 1 zum Nachweis einer EHEC Infektion.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt der Amplifikationsreaktion zusätzlich durch Hybridisierung detektiert wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass eine Hybridisations-Sonde eine Sequenz aufweist, die identisch oder komplementär zu der Region des stxA1Gens bzw. des stxA2 Gens ist, die für das enzymatisch aktive Zentrum der kodierten Polypeptidkette kodiert.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2-5, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe von Fluoreszenzdetektion nachgewiesen wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe einer bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoreszierenden Verbindung detektiert wird.
8. Verfahren gemäß Anspruch 4-6, dadurch gekennzeichnet, dass das Amplifikationsprodukt mithilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nachgewiesen wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem ein interner Standard eingesetzt wird, welcher sich von der stxA1 oder der stxA2 Sequenz nur in ein oder zwei Punktmutationen unterscheidet, dadurch gekennzeichnet, dass amplifizierte Target-DNA und interner Standard mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse voneinander unterschieden werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, das Human-pathogenes stxA2 und Schweine-pathogenes stxA2_e mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse unterschieden werden.
11. Hybridisations-Sonden mit Sequenzen oder Teilsequenzen gemäß SEQ ID NO 5-7.
12. Hybridisations-Sonde mit der Sequenz gemäß SEQ ID NO 8.
13. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass Hybridisations-Sonden mit Sequenzen gemäß Anspruch 11 oder 12 verwendet werden.
14. Verwendung von Hybridisations-Sonden gemäß Anspruch 11 oder 12 zur Bestimmung von Schmelzkurven.
15. Kit zum Nachweis klinisch relevanter EHEC-Infektionen, enthaltend Primer gemäß Anspruch 1.
16. Kit gemäß Anspruch 15 enthaltend Hybridisations-Sonden.
17. Kit gemäß Anspruch 15 oder 16, enthaltend Reagenzien zur Amplifikation zusätzlicher Pathogenitätsfaktoren.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 5298/00/WO-HIL	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP 00/ 09356	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 26/09/2000	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/09/1999
Anmelder ROCHE DIAGNOSTICS GMBH		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.



Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das



in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.



zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.



bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.



Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.



Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.



Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3.



Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**



wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.



wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats aus dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____



wie vom Anmelder vorgeschlagen



weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.



weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



keine der Abb.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09356

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SHARMA V K ET AL.: "Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of Escherichia coli 0157:H7 and other Shiga toxigenic E.coli" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, Bd. 13, August 1999 (1999-08), Seiten 291-302, XP001001372 das ganze Dokument	2,3,6
X	FAGAN P K ET AL.: "Detection of Shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 65, Nr. 2, Februar 1999 (1999-02), Seiten 868-872, XP001001377 das ganze Dokument	2,3

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

12. Juni 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

19/06/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Knehr, M.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ALS BEZUG NEHME UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>READ S C ET AL: "POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF VEROCYTOTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM ANIMAL AND FOOD SOURCES" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, Bd. 6, Nr. 2, 1992, Seiten 153-161, XP000993359 ISSN: 0890-8508 das ganze Dokument</p> <p>----</p>	2,3
X	<p>FRANCK S M ET AL.: "Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 36, Nr. 6, Juni 1998 (1998-06), Seiten 1795-1797, XP001001373 das ganze Dokument</p> <p>----</p>	2,3
X	<p>GANNON V P J ET AL.: "Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli on ground beef using the polymerase chain reaction" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 58, Nr. 12, Dezember 1992 (1992-12), Seiten 3809-3815, XP001001444 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>----</p>	2,3
X	<p>PATON A W ET AL: "DETECTION AND CHARACTERIZATION OF SHIGA TOXIGENIC ESCHERICHIA COLI BY USING MULTIPLEX PCR ASSAYS FOR STX1, STX2, EAEA, ENTEROHEMORRHAGIC E. COLI HLYA, RFBA, RFB0111, AND RFB0157" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, Bd. 36, Nr. 2, 1998, Seiten 598-602, XP000908789 ISSN: 0095-1137 das ganze Dokument</p> <p>----</p>	2,3
X	<p>EP 0 864 657 A (VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES C) 16. September 1998 (1998-09-16)</p>	11
Y	<p>* siehe insbesondere Sequenz in Anspruch 1 * das ganze Dokument</p> <p>----</p>	12-15
Y	<p>US 5 652 102 A (WIEDMANN MARTIN ET AL) 29. Juli 1997 (1997-07-29) das ganze Dokument</p> <p>----</p>	2-10, 12-15

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH A...EHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97 46707 A (RASMUSSEN RANDY P ;UNIV UTAH RES FOUND (US); RIRIE KIRK M (US); WI) 11. Dezember 1997 (1997-12-11) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	2-10,13
Y	CHEN S ET AL.: "An automated fluorescent PCR method for detection of shiga toxin-producing Escherichia coli in foods" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 64, Nr. 11, November 1998 (1998-11), Seiten 4210-4216, XP001001375 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	2-8,14, 15
Y	KIDO C ET AL: "Rapid and simple detection of PCR product DNA: a comparison between Southern hybridization and fluorescence polarization analysis" GENE,ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM,NL, Bd. 259, Nr. 1-2, 23. Dezember 2000 (2000-12-23), Seiten 123-127, XP004228429 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument ---	2-4,6,7, 10,12
Y	FRANKE S ET AL.: "Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli O101 strains of human and porcine origin" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 33, Nr. 12, Dezember 1995 (1995-12), Seiten 3174-3178, XP001001374 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	2-4,6,7, 10,12
A	DE 197 21 825 A (KARCH HELGE PROF DR) 3. Dezember 1998 (1998-12-03) das ganze Dokument ---	
A	US 5 475 098 A (HALL ROBERT H ET AL) 12. Dezember 1995 (1995-12-12) das ganze Dokument ---	
T	BELLIN T ET AL.: "Rapid detection of enterohemorrhagic Escherichia coli by real-time PCR with fluorescent hybridization probes" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 39, Nr. 1, Januar 2001 (2001-01), Seiten 370-374, XP000994590 das ganze Dokument -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09356

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
EP 0864657	A	16-09-1998	FR	2760749 A	18-09-1998
US 5652102	A	29-07-1997	KEINE		
WO 9746707	A	11-12-1997	AU	727296 B	07-12-2000
			AU	3154797 A	05-01-1998
			AU	729644 B	08-02-2001
			AU	3380097 A	05-01-1998
			AU	726501 B	09-11-2000
			AU	3481297 A	05-01-1998
			CA	2256773 A	11-12-1997
			CA	2257109 A	11-12-1997
			EP	0912760 A	06-05-1999
			EP	0906449 A	07-04-1999
			EP	0912766 A	06-05-1999
			EP	1033411 A	06-09-2000
			JP	2000512138 T	19-09-2000
			JP	2000511435 T	05-09-2000
			JP	2000509608 T	02-08-2000
			WO	9746712 A	11-12-1997
			WO	9746714 A	11-12-1997
			US	6232079 B	15-05-2001
			US	6174670 B	16-01-2001
DE 19721825	A	03-12-1998	KEINE		
US 5475098	A	12-12-1995	AU	2965695 A	05-01-1996
			WO	9534682 A	21-12-1995
			US	5756293 A	26-05-1998

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
PCT WO 01/23607 A3

(51) Internationale Patentklassifikation: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09356

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. September 2000 (26.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 46 296.8 28. September 1999 (28.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): CYTONET GMBH & CO. KG [DE/DE]; Albert-
Ludwig-Grimm-Strasse 20, D-69469 Weinheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GUNZER, Florian
[DE/DE]; Tiergartenstrasse 60, 30559 Hannover (DE).
BELLIN, Tobias [DE/DE]; Klewertweg 62, 30966 Hem-
mingen (DE).

(74) Anwalt: SCHRELL, Andreas; Gleiss & Große, May-
bachstrasse 6A, D-70469 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen

Recherchenberichts: 6. Dezember 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MULTIPLEX PCR FOR DETECTING EHEC INFECTIONS

(54) Bezeichnung: MULTIPLEX-PCR ZUM NACHWEIS VON EHEC-INFEKTIONEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting clinically relevant EHEC infections by amplifying both stxA1 and stxA2 sequences in a multiplex amplification reaction. The inventive method is further characterized in that both sequences of human-pathogenic and sequences of porcine-pathogenic stxA2 isoforms are amplified with the primers derived from a specific region of the stxA2 gene.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen, bei dem durch eine Multiplex-Amplifikationsreaktion sowohl stxA1 als auch stxA2 Sequenzen amplifiziert werden. Das Verfahren zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß sowohl Sequenzen Human-pathogener als auch Sequenzen Schweine-pathogener stxA2 Isoformen mit Primern aus einer bestimmten Region des stxA2 Gens amplifiziert werden.

WO 01/23607 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
PCT/EP 00/09356

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	SHARMA V K ET AL.: "Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of Escherichia coli 0157:H7 and other Shiga toxigenic E.coli" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, vol. 13, August 1999 (1999-08), pages 291-302, XP001001372 the whole document	2,3,6
X	FAGAN P K ET AL.: "Detection of Shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 65, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 868-872, XP001001377 the whole document	2,3
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>* & * document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">12 June 2001</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">19/06/2001</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center;">Knehr, M</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Application No

PCT/EP 00/09356

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>READ S C ET AL: "POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF VEROCYTOTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM ANIMAL AND FOOD SOURCES" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, vol. 6, no. 2, 1992, pages 153-161, XP000993359 ISSN: 0890-8508 the whole document</p>	2,3
X	<p>FRANCK S M ET AL.: "Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 36, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 1795-1797, XP001001373 the whole document</p>	2,3
X	<p>GANNON V P J ET AL.: "Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli on ground beef using the polymerase chain reaction" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 58, no. 12, December 1992 (1992-12), pages 3809-3815, XP001001444 cited in the application the whole document</p>	2,3
X	<p>PATON A W ET AL: "DETECTION AND CHARACTERIZATION OF SHIGA TOXIGENIC ESCHERICHIA COLI BY USING MULTIPLEX PCR ASSAYS FOR STX1, STX2, EAEA, ENTEROHEMORRHAGIC E. COLI HLYA, RFBA, RFB0111, AND RFB0157" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 36, no. 2, 1998, pages 598-602, XP000908789 ISSN: 0095-1137 the whole document</p>	2,3
X	<p>EP 0 864 657 A (VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES C) 16 September 1998 (1998-09-16)</p>	11
Y	<p>* see in particular sequence in claim 1 the whole document</p>	12-15
Y	<p>US 5 652 102 A (WIEDMANN MARTIN ET AL) 29 July 1997 (1997-07-29) the whole document</p>	2-10, 12-15

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

na | Application No

PCT/EP 00/09356

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 46707 A (RASMUSSEN RANDY P ;UNIV UTAH RES FOUND (US); RIRIE KIRK M (US); WI) 11 December 1997 (1997-12-11) cited in the application the whole document ---	2-10,13
Y	CHEN S ET AL.: "An automated fluorescent PCR method for detection of shiga toxin-producing Escherichia coli in foods" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 64, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 4210-4216, XP001001375 cited in the application the whole document ---	2-8,14,15
Y	KIDO C ET AL: "Rapid and simple detection of PCR product DNA: a comparison between Southern hybridization and fluorescence polarization analysis" GENE,ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM,NL, vol. 259, no. 1-2, 23 December 2000 (2000-12-23), pages 123-127, XP004228429 ISSN: 0378-1119 the whole document ---	2-4,6,7,10,12
Y	FRANKE S ET AL.: "Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli 0101 strains of human and porcine origin" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 33, no. 12, December 1995 (1995-12), pages 3174-3178, XP001001374 cited in the application the whole document ---	2-4,6,7,10,12
A	DE 197 21 825 A (KARCH HELGE PROF DR) 3 December 1998 (1998-12-03) the whole document ---	
A	US 5 475 098 A (HALL ROBERT H ET AL) 12 December 1995 (1995-12-12) the whole document ---	
T	BELLIN T ET AL.: "Rapid detection of enterohemorrhagic Escherichia coli by real-time PCR with fluorescent hybridization probes" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 39, no. 1, January 2001 (2001-01), pages 370-374, XP000994590 the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

mat patent family members

Intern Application No

PCT/EP 00/09356

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0864657	A	16-09-1998	FR 2760749 A	18-09-1998
US 5652102	A	29-07-1997	NONE	
WO 9746707	A	11-12-1997	AU 727296 B	07-12-2000
			AU 3154797 A	05-01-1998
			AU 729644 B	08-02-2001
			AU 3380097 A	05-01-1998
			AU 726501 B	09-11-2000
			AU 3481297 A	05-01-1998
			CA 2256773 A	11-12-1997
			CA 2257109 A	11-12-1997
			EP 0912760 A	06-05-1999
			EP 0906449 A	07-04-1999
			EP 0912766 A	06-05-1999
			EP 1033411 A	06-09-2000
			JP 2000512138 T	19-09-2000
			JP 2000511435 T	05-09-2000
			JP 2000509608 T	02-08-2000
			WO 9746712 A	11-12-1997
			WO 9746714 A	11-12-1997
			US 6232079 B	15-05-2001
			US 6174670 B	16-01-2001
DE 19721825	A	03-12-1998	NONE	
US 5475098	A	12-12-1995	AU 2965695 A	05-01-1996
			WO 9534682 A	21-12-1995
			US 5756293 A	26-05-1998

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

nr: ales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09356

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) STRAND, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SHARMA V K ET AL.: "Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of Escherichia coli 0157:H7 and other Shiga toxigenic E.coli" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, Bd. 13, August 1999 (1999-08), Seiten 291-302, XP001001372 das ganze Dokument	2,3,6
X	FAGAN P K ET AL.: "Detection of Shiga-like toxin (stx1 and stx2), intimin (eaeA), and enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) hemolysin (EHEC hlyA) genes in animal feces by multiplex PCR" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 65, Nr. 2, Februar 1999 (1999-02), Seiten 868-872, XP001001377 das ganze Dokument	2,3
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 12. Juni 2001		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 19/06/2001
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Knehr, M

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Inter: des Aktenzeichen

PCT/EP 00/09356

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beir. Anspruch Nr.
X	<p>READ S C ET AL: "POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTION OF VEROCYTOTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM ANIMAL AND FOOD SOURCES" MOLECULAR AND CELLULAR PROBES, ACADEMIC PRESS, LONDON, GB, Bd. 6, Nr. 2, 1992, Seiten 153-161, XP000993359 ISSN: 0890-8508 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	2,3
X	<p>FRANCK S M ET AL.: "Multiplex PCR for enterotoxigenic, attaching and effacing, and shiga toxin-producing Escherichia coli strains from calves" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 36, Nr. 1, Juni 1998 (1998-06), Seiten 1795-1797, XP001001070 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	2,3
X	<p>GANNON V P J ET AL.: "Rapid and sensitive method for detection of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli on ground beef using the polymerase chain reaction" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 58, Nr. 12, Dezember 1992 (1992-12), Seiten 3809-3815, XP001001444 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>---</p>	2,3
X	<p>PATON A W ET AL: "DETECTION AND CHARACTERIZATION OF SHIGA TOXIGENIC ESCHERICHIA COLI BY USING MULTIPLEX PCR ASSAYS FOR STX1, STX2, EAEA, ENTEROHEMORRHAGIC E. COLI HLYA, RFBA, RFB0111, AND RFB0157" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, Bd. 36, Nr. 2, 1998, Seiten 598-602, XP000908789 ISSN: 0095-1137 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	2,3
X	<p>EP 0 864 657 A (VETERINAIRES ET ALIMENTAIRES C) 16. September 1998 (1998-09-16)</p>	11
Y	<p>* siehe insbesondere Sequenz in Anspruch 1 * das ganze Dokument</p> <p>---</p>	12-15
Y	<p>US 5 652 102 A (WIEDMANN MARTIN ET AL) 29. Juli 1997 (1997-07-29) das ganze Dokument</p> <p>---</p>	2-10, 12-15

-/--

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

18 des Aktenzeichen

PCT/EP 00/09356

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97 46707 A (RASMUSSEN RANDY P ;UNIV UTAH RES FOUND (US); RIRIE KIRK M (US); WI) 11. Dezember 1997 (1997-12-11) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	2-10,13
Y	CHEN S ET AL.: "An automated fluorescent PCR method for detection of shiga toxin-producing Escherichia coli in foods" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 64, Nr. 11, November 1998 (1998-11), Seiten 4210-4216, XP001001375 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	2-8,14, 15
Y	KIDO C ET AL: "Rapid and simple detection of PCR product DNA: a comparison between Southern hybridization and fluorescence polarization analysis" GENE, ELSEVIER BIOMEDICAL PRESS. AMSTERDAM, NL, Bd. 259, Nr. 1-2, 23. Dezember 2000 (2000-12-23), Seiten 123-127, XP004228429 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument ----	2-4,6,7, 10,12
Y	FRANKE S ET AL.: "Clonal relatedness of Shiga-like toxin-producing Escherichia coli 0101 strains of human and porcine origin" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 33, Nr. 12, Dezember 1995 (1995-12), Seiten 3174-3178, XP001001374 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ----	2-4,6,7, 10,12
A	DE 197 21 825 A (KARCH HELGE PROF DR) 3. Dezember 1998 (1998-12-03) das ganze Dokument ----	
A	US 5 475 098 A (HALL ROBERT H ET AL) 12. Dezember 1995 (1995-12-12) das ganze Dokument ----	
T	BELLIN T ET AL.: "Rapid detection of enterohemorrhagic Escherichia coli by real-time PCR with fluorescent hybridization probes" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 39, Nr. 1, Januar 2001 (2001-01), Seiten 370-374, XP000994590 das ganze Dokument -----	1-16

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur Patentfamilie gehören

Internat Aktenzeichen
PCT/Er 00/09356

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0864657 A	16-09-1998	FR 2760749 A	18-09-1998
US 5652102 A	29-07-1997	KEINE	
WO 9746707 A	11-12-1997	AU 727296 B	07-12-2000
		AU 3154797 A	05-01-1998
		AU 729644 B	08-02-2001
		AU 3380097 A	05-01-1998
		AU 726501 B	09-11-2000
		AU 3481297 A	05-01-1998
		CA 2256773 A	11-12-1997
		CA 2257109 A	11-12-1997
		EP 0912760 A	06-05-1999
		EP 0906449 A	07-04-1999
		EP 0912766 A	06-05-1999
		EP 1033411 A	06-09-2000
		JP 2000512138 T	19-09-2000
		JP 2000511435 T	05-09-2000
		JP 2000509608 T	02-08-2000
		WO 9746712 A	11-12-1997
		WO 9746714 A	11-12-1997
		US 6232079 B	15-05-2001
		US 6174670 B	16-01-2001
DE 19721825 A	03-12-1998	KEINE	
US 5475098 A	12-12-1995	AU 2965695 A	05-01-1996
		WO 9534682 A	21-12-1995
		US 5756293 A	26-05-1998

(12) NACH DEM VERFAHREN ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
5. April 2001 (05.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/23607 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09356

(22) Internationales Anmeldedatum:
26. September 2000 (26.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 46 296.8 28. September 1999 (28.09.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE/DE]; 68298
Mannheim (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GUNZER, Florian
[DE/DE]; Tiergartenstrasse 60, 30559 Hannover (DE).
BELLIN, Tobias [DE/DE]; Klewertweg 62, 30966 Hem-
mingen (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: ROCHE DIAGNOSTICS
GMBH; Patentabteilung, 82372 Penzberg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MULTIPLEX PCR FOR DETECTING EHEC INFECTIONS

(54) Bezeichnung: MULTIPLEX-PCR ZUM NACHWEIS VON EHEC-INFEKTIONEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting clinically relevant EHEC infections by amplifying both stxA1 and stxA2 sequences in a multiplex amplification reaction. The inventive method is further characterized in that both sequences of human-pathogenic and sequences of porcine-pathogenic stxA2 isoforms are amplified with the primers derived from a specific region of the stxA2 gene.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen, bei dem durch eine Multiplex-Amplifikationsreaktion sowohl stxA1 als auch stxA2 Sequenzen amplifiziert werden. Das Verfahren zeichnet sich insbesondere dadurch aus, daß sowohl Sequenzen Human-pathogener als auch Sequenzen Schweine-pathogener stxA2 Isoformen mit Primern aus einer bestimmten Region des stxA2 Gens amplifiziert werden.

WO 01/23607 A2

Multiplex-PCR zum Nachweis von EHEC-Infektionen

Die vorliegende Erfindung entstammt dem diagnostischen Gebiet des Nachweises von hämorrhagischen Durchfallerkrankungen.

Entero-hämorrhagische E.coli-Erreger (EHEC) sind gefährliche Erreger von Durchfallerkrankungen, die sowohl durch Nahrungsmittel als auch durch Schmierinfektionen übertragen werden können. Entero-hämorrhagische E.coli Keime sind in der Lage, hochpotente Zytotoxine zu bilden. Dabei handelt es sich um Proteine, die grosse Ähnlichkeit mit dem Shiga-Toxin von Shigella dysenteriae Typ 1 besitzen und deshalb Shiga-Toxin 1 und Shiga-Toxin 2 genannt werden. Die dafür codierenden Gene für die jeweiligen Untereinheiten A und B werden mit stxA1 (Computer-Accessionsnummer M19473) und stxB1 (Computer-Accessionsnummer M19473) bzw. stxA2 (Computer-Accessionsnummer X07865) und stxB2 (Computer-Accessionsnummer X07865) bezeichnet. Pathogene E.coli Stämme können entweder eines der beiden Shiga-Toxin-Gene oder aber auch beide enthalten. Darüber hinaus können die Erreger weitere assoziierte Virulenz-Faktoren wie EHEC-Intimin, EHEC-Hämolysin, EHEC-Katalase, EHEC-Serinprotease sowie EHEC-Enterotoxin aufweisen.

Der diagnostische Nachweis von EHEC ist wegen der Übertragungswege und der mit etwa 10^2 - 10^3 Keimen geringen Infektionsdosis nicht nur bei akut Erkrankten wichtig, sondern auch, um eventuelle Ausscheider zu identifizieren oder andere Infektionsquellen ausfindig zu machen. Nach dem Stand der Technik werden EHEC-Infektionen auf mikrobiologischem Wege mit Sorbit McConkey Selektivagarplatten oder mit Hilfe von Toxin-ELISAs nachgewiesen. Darüber hinaus existieren PCR-Nachweismethoden, mit deren Hilfe Shiga-Toxin-Gensequenzen nachgewiesen werden können (zB. Chen et al., Applied and Environmental Microbiology Vol. 64 No. 11, S. 4210-4116, 1998; Gannon et al., Applied and Environmental Microbiology, Vol. 58 No. 12, S. 3809-3815, 1992; Pierard et al., Journal of Clinical Microbiology Vol. 36, No.11, S. 3317-3322,). In der Routinediagnostik werden gegenwärtig jedoch ausschließlich Verfahren angewendet, welche die für die B Untereinheit kodierende Sequenz amplifizieren.

Eine Sequenzanalyse der Shiga-Toxin-Gene verschiedener Isolate hat gezeigt, dass sich nicht nur die Primärsequenzen von Shiga-Toxin 1 und Shiga-Toxin 2 voneinander unterscheiden, sondern daß darüber hinaus auch unterschiedliche EHEC-Isolate, bei denen Shiga-Toxin 2 immunologisch nachgewiesen werden kann hinsichtlich der Sequenz des entsprechenden Gens unterschiedliche Allele aufweisen. Somit sind nur solche Primer-Sequenzen zum diagnostischen Nachweis von Shiga-Toxin 2 geeignet, die gegen hochkonservierte Regionen innerhalb der Shiga-Toxin Gene gerichtet sind und somit die Sequenzen sämtlicher Allele detektieren können.

Zusätzlich zu den klassischen, durch bekannte Human-pathogene EHEC-Erreger verursachte Durchfallerkrankungen existieren andere Durchfallerkrankungen mit einem ähnlichen Krankheitsbild. Bei diesen Erkrankungen konnten ebenfalls entero-hämorrhagische Erreger als Ursache durch Tests mit Verozellkulturen diagnostiziert werden (Pierard et al., Lancet 338, S. 762, 1991; Thomas et al., Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 13, S. 1074-1076, 1994). Allerdings waren diese Infektionen nicht durch molekulare Methoden gemäß dem Stand der Technik zum Nachweis Human-pathogener EHEC-Infektionen nachweisbar (Pierard et al., J.Clin.Microbiol. 36, S. 3317-3322, 1998). Da entsprechende immunologische Tests nur begrenzte Spezifität besitzen, wurden aufwendige mikrobiologische Anreicherungsverfahren und daran anschließende molekulare Sequenzanalysen durchgeführt. Dabei konnten derartige Erreger als entero-hämorrhagische E.coli-Stämme identifiziert werden, die bisher lediglich als Shiga-Toxin-produzierende Schweine-pathogene Keime bekannt waren (Pierard et al., Lancet 338, S. 762, 1991; Thomas et al., Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis. 13, S. 1074-1076, 1994). Die Sequenzen der Shiga-Toxin-Gene dieser Schweine-pathogenen Isolate unterscheiden sich deutlich von denen Human-pathogener Stämme und werden mit stx_{2e} bezeichnet (Weinstein et al., J.Bacteriol. 170, S. 4223-4230, 1988; Franke et al., Journal of Clinical Microbiology Vol. 33 No. 12, S. 3174-3178, 1995).

Somit existiert bislang kein einfaches immunologisches oder molekularbiologisches Verfahren, mit dessen Hilfe die verantwortlichen Erreger sämtlicher entero-hämorrhagischer Durchfallerkrankungen beim Menschen nachgewiesen werden können.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Bereitstellung eines Verfahrens, mit dem sowohl Human-pathogene als auch Schweine-pathogene EHEC-Erreger durch eine einzige Nachweisreaktion zu identifizieren sind.

Diese Aufgabe wird durch eine Nukleinsäure-Amplifikationsreaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen gelöst, bei dem gleichzeitig stxA1 und stxA2 Sequenzen identifiziert werden können, die sowohl von Human-pathogenen als auch von Schweine-pathogenen Erregern stammen.

Gegenstand der Erfindung ist somit ein Verfahren, bei dem in einer Multiplex-Amplifikations-Reaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen sowohl stxA1- als auch stxA2-Sequenzen amplifiziert werden, welches insbesondere dadurch gekennzeichnet ist, dass sowohl Human-pathogene stxA2 Isoformen als auch Schweine-pathogene stxA2-Isoformen amplifiziert werden. Dabei bezieht sich der Begriff „Multiplex-Amplifikations-Reaktion“ auf PCR-Verfahren, bei denen mindestens zwei verschiedene Primer-Paare verwendet werden, von denen ein Primer-Paar zur Amplifikation von stxA1-Sequenzen und ein zweites Primer-Paar zur Amplifikation von stxA2-Sequenzen verwendet wird. Der Begriff „Schweine-Pathogen“ wird im Rahmen dieser Anmeldung für Erreger verwendet, die ein Shiga-Toxin Gen stx2_e (Weinstein et al., J.Bacteriol. 170, S. 4223-4230, 1988), Computer-Accessionsnummer: M21534) aufweisen und primär beim Schwein die Ödemkrankheit auslösen, aber auch beim Menschen zu Durchfallerkrankungen und extraintestinalen Krankheitsmanifestationen führen können.

Besonders geeignet zur Durchführung des erfindungsgemässen Verfahrens haben sich Primer einer Länge von 17-25 Nukleotiden erwiesen, deren Sequenzen entweder identisch mit einer Sequenz gemäss SEQ ID NO 1-4 ist, deren Sequenzen kontinuierliche Teilsequenzen einer der Sequenzen gemäss SEQ ID NO 1-4 darstellen, oder bei denen eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 eine kontinuierliche Teilsequenz des Primers bildet. Die Verwendung von einem oder mehrerer der erfindungsgemässen Primer zum Nachweis von EHEC-Infektionen ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Als vorteilhaft haben sich somit Multiplex-Amplifikations-Reaktionen zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen erwiesen, bei denen entweder ein, mehrere oder alle erfindungsgemässen Primer verwendet werden.

In der Regel werden als Primer chemisch synthetisierte deoxy-Ribonukleotide verwendet. Allerdings können im Prinzip auch andere Nukleinsäuremoleküle oder deren Derivate wie beispielsweise PNA (Peptide Nucleic Acids) eingesetzt werden. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Primer auch mit detektierbaren oder immobilisierbaren Molekülen konjugiert sein.

In einer speziellen Ausführungsform der erfindungsgemässen Verfahrens wird das Produkt der Amplifikation zur Erhöhung der Sensitivität des Assays zusätzlich durch Hybridisierung detektiert. Die dafür geeigneten Hybridisations-Sonden besitzen vorzugsweise eine Länge von 25-35 Nukleotiden. In der Regel werden ebenfalls chemisch synthetisierte deoxy-Ribonukleotide verwendet, die wahlweise durch andere Nukleinsäuremoleküle oder deren Derivate wie beispielsweise PNA (Peptide Nucleic Acids) ersetzt werden können. Definitionsgemäß sind diese Sonden mit einer detektierbaren Markierung konjugiert. Dabei kann es sich zum Beispiel um einen Fluoreszenzfarbstoff, ein Enzym, ein radioaktives Atom oder um eine massenspektrometrisch nachweisbare Gruppe handeln.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind deshalb Hybridisations-Sonden mit einer Sequenz oder Teilsequenz gemäß SEQ ID NO 5-8. Es hat sich jedoch als vorteilhaft erwiesen, wenn eine Hybridisations-Sonde eine Sequenz aufweist, die identisch oder komplementär zu einer Region des stxA1-Gens bzw. des stxA2-Gens ist, welche dem enzymatisch aktiven Zentrum der durch diese Gene kodierten Polypeptid-Kette entspricht. In der Sequenz von stxA2 befindet sich dieses aktive Zentrum an Nukleotidposition 803-805 (Jackson et al, J. Bacteriol. 172, S. 3346-3350, 1990). Hybridisations-Sonden mit einer Sequenz oder Teilsequenz gemäß SEQ ID NO 8 sind somit besonders bevorzugt.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform werden die erfindungsgemäss erhaltenen Multiplex-Amplifikationsprodukte mit Hilfe von Fluoreszenz-Detektion nachgewiesen. Bei der Wahl eines geeigneten fluoreszierenden Agens kann dieses bereits zum PCR-Ansatz hinzugegeben werden, ohne die Effizienz der Amplifikation zu beeinträchtigen. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, dass die PCR-Reaktion in Gegenwart einer fluoreszierenden Verbindung durchgeführt wird, die bei Bindung an doppelsträngige DNA-Moleküle und Anregung mit Licht einer geeigneten Wellenlänge fluoreszierende Signale emittiert (WO 97/46707):

Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein Verfahren, bei dem die Multiplex-Amplifikationsprodukte mit Hilfe einer bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoreszierenden Verbindung detektiert werden. Beispielsweise kann der Fluoreszenz-Farbstoff SybrGreen für ein derartiges Verfahren eingesetzt werden (WO 97/46714).

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Verfahren, bei dem die stx-Sequenzen mit Hilfe einer oder mehrerer Fluoreszenz-markierter Hybridisationssonden nachgewiesen werden. Dabei sind verschiedene Ausführungsformen, wie etwa die Verwendung von Molecular Beacons (WO 95/13399, US-Patent Nr. 5,118,801) oder sogenannte TaqMan-Probes (WO 96/34983) möglich.

Für den quantitativen Nachweis von Nukleinsäuren sind auch mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Hybridisierungssonden wie beispielsweise Oligonukleotide geeignet, deren Bindung an ein Nukleinsäure-Target nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Elektronen-Transfers (FRET) detektiert werden kann (WO 97/46707). Dabei wird eine sogenannte Donor-Komponente, beispielsweise Fluorescein, mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Bei räumlicher Nähe zu einer geeigneten Akzeptorkomponente wie beispielsweise bestimmten Rhodamin-Derivaten erfolgt dann ein Resonanz-Energie-Transfer auf die Akzeptorkomponente, sodaß das Akzeptormolekül Licht einer bestimmten Emissionswellenlänge emittiert.

Die Markierungen der Hybridisations-Sonden können nach Standardmethoden am 5' Ende, am 3' Ende oder auch intern erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die verschiedenen Farbstoffe an zwei verschiedene Hybridisierungssonden gebunden, die in räumlicher Nähe an die Target-Nukleinsäure hybridisieren können. Wenn bei dieser Ausführungsform beide Hybridisations-Sonden an die Target-DNA gebunden sind, befinden sich auch beide Komponenten des FRET-Systems in räumlicher Nähe zueinander, sodaß Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer gemessen werden kann. Dadurch wird indirekt eine Quantifizierung der Target-DNA möglich.

Die zwei Oligonukleotid-Sonden können dabei an den gleichen Strang der Target-Nukleinsäure hybridisieren, wobei der eine Farbstoff sich vorzugsweise am 3'-terminalen Nukleotid der ersten Sonde befindet und der andere Farbstoff sich vorzugsweise am 5'-terminalen Nukleotid der zweiten Sonde befindet, sodaß die Distanz zwischen beiden nur eine

geringe Anzahl von Nukleotiden beträgt, wobei diese Anzahl zwischen 0 und 30 liegen kann. Bei Verwendung von Fluorescein in Kombination mit einem Rhodamin-Derivat wie beispielsweise LC-RED-640 oder LC-RED-705 (Roche Molecular Biochemicals) haben sich Abstände von 0-15, insbesondere 1-5 Nukleotiden und in vielen Fällen von einem Nukleotid als vorteilhaft herausgestellt. Unter Wahrung der Nukleotid-Abstände zwischen den Farbstoffkomponenten können auch Sonden verwendet werden, die nicht terminal, sondern intern mit einem der Farbstoffe konjugiert sind. Bei doppelsträngigen Target-Nukleinsäuren können auch Sonden eingesetzt werden, die an verschiedene Stränge des Targets binden, sofern ein bestimmter Nukleotidabstand von 0 bis 30 Nukleotiden zwischen den beiden Farbstoff-Komponenten eingehalten wird.

Als besonders vorteilhaft haben sich demnach erfindungsgemäße Verfahren herausgestellt, bei denen stxA1 und stxA2 mit Hilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer nachgewiesen wird. Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls Hybridisations-Sonden mit einer Sequenz oder Teilsequenz gemäß SEQ ID NO 5-8 sowie Verfahren, in denen diese spezifischen Hybridisations-Sonden zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen eingesetzt werden.

Eine spezifische Ausführungsform der Erfindung stellen somit auch Fluoreszenz-markierte Sonden-Paare entweder gemäß SEQ ID NO 5 und 6 oder gemäß SEQ ID NO 7 und 8 dar, welche vorteilhafterweise mit jeweils einer FRET-Donor-Komponente wie beispielsweise Fluorescein bzw. mit einer FRET-Akzeptor-Komponente wie beispielsweise Cy5, LC-RED-640, LC-RED-705 oder einem anderen Rhodamin-Derivat markiert sind. Entsprechend markierte Oligonukleotidkombinationen werden im Folgenden als "FRET-Paare" bezeichnet.

Als besonders vorteilhaft hat sich der Einsatz derartiger FRET-Paare zum Nachweis von Amplifikationsprodukten während oder nach einer Multiplex-Amplifikationsreaktion herausgestellt. In einer besonderen Ausführungsform kann einer der beiden Amplifikationsprimer zugleich mit einem der beiden eingesetzten Farbstoffe markiert sein und somit eine der beiden Komponenten des FRET beisteuern.

Der Einsatz von geeigneten FRET-Paaren zur Detektion der Multiplex-Amplifikationsprodukte ermöglicht ein paralleles, sogenanntes "Real-Time Monitoring" von PCR-Reaktionen, wobei Daten zur Generierung des Amplifikationsprodukts in Abhängigkeit

von der Zahl der durchlaufenen Reaktionszyklen ermittelt werden können. Dies geschieht in der Regel dadurch, daß aufgrund der Reaktions- und Temperaturbedingungen während des notwendigen Annealings der Amplifikationsprimer an die nachzuweisende Nukleinsäure auch die Oligonukleotide des FRET-Paares an die Target-Nukleinsäure hybridisieren und bei geeigneter Anregung ein entsprechend messbares Fluoreszenzsignal emittiert wird. Aufgrund der erhaltenen Daten kann somit die Menge der ursprünglich eingesetzten Target-Nukleinsäure quantitativ bestimmt werden.

In einer anderen, bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Detektion der Multiplex-Amplifikationsprodukte nach Beendigung der Amplifikationsreaktion, wobei nach Hybridisierung des FRET-Paares an die zu detektierende Target-Nukleinsäure die Temperatur im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse kontinuierlich erhöht wird. Gleichzeitig wird die in Abhängigkeit von der Temperatur emittierte Fluoreszenz gemessen und auf diese Weise eine Schmelztemperatur bestimmt, bei dem das eingesetzte FRET-Paar nicht mehr an die nachzuweisende Sequenz hybridisiert. Bei einem Auftreten von Mismatches zwischen dem eingesetzten FRET-Paar und dem Amplifikationsprodukt wird der Schmelzpunkt signifikant erniedrigt. Auf diese Weise können mit einem FRET-Paar verschiedene Target-Nukleinsäuren identifiziert werden, deren Sequenzen sich voneinander geringfügig durch eine oder wenige Punktmutationen unterscheiden.

Erfindungsgemäß wird dieses Prinzip in einer Multiplex-Amplifikationsreaktion zum Nachweis von EHEC Infektionen angewandt, bei der ein interner Standard eingesetzt wird, welcher sich von der stxA1 oder der stxA2 Wildtyp-Sequenz (Computer-Accessionsnummer X07865) nur in ein oder zwei Punktmutationen unterscheidet. Somit können amplifizierte Target-Nukleinsäure und amplifizierter interner Standard mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse voneinander unterschieden werden.

Dabei wird der Standard vorzugsweise nur in geringen Mengen von etwa 100 Plasmidkopien ($1,7 \cdot 10^{-22}$ mol) eingesetzt, sodaß ein positives Signal hinsichtlich der Amplifikation des internen Standards nicht nur anzeigt, daß die PCR im jeweiligen Ansatz nicht in irgendeiner Weise inhibiert worden ist, sondern auch eine Kontrolle hinsichtlich der Sensitivität der Reaktion darstellt.

Ein weiterer Aspekt des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Unterscheidung von Human-pathogenem stxA2 und Schweine-pathogenem stxA2, mithilfe der beschriebenen Schmelzkurvenanalyse.

Die Verwendung von FRET Paaren gem. SEQ ID NO 5 und 6 oder 7 und 8 zur Bestimmung von Schmelzkurven oder zur Unterscheidung von Human-pathogenem stx und Schweine-pathogenem stx ist in diesem Zusammenhang ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Dabei wird vorzugsweise ein FRET-Paar gem. SEQ ID NO 7 und 8 verwendet.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind darüber hinaus Kits, die verschiedene Reagenzien zur Durchführung der erfindungsgemäßen Verfahren enthalten. Derartige erfindungsgemäße Kits enthalten in der Regel Amplifikations-Primer zur Durchführung einer Multiplex-PCR gem. SEQ ID NO 1-4. Vorzugsweise können diese Kits zusätzlich auch Hybridisations-Sonden beispielsweise mit Sequenzen gemäß SEQ ID NO 5-8 enthalten.

Darüber hinaus können diese Kits erfindungsgemäss zusätzlich Primer und Hybridisations-Sonden zur Amplifikation von DNA einzelner oder mehrerer zusätzlicher EHEC Virulenz-Faktoren wie beispielsweise EHEC-Intimin, EHEC-Hämolysin, EHEC-Katalase, EHEC-Serinprotease sowie EHEC-Enterotoxin enthalten. Sämtliche erfindungsgemäßen Kits können schliesslich zusätzlich Reagenzien enthalten, die generell zur Durchführung von Nukleinsäure-Amplifikationsreaktionen geeignet sind. Vorzugsweise, aber nicht ausschliesslich handelt es sich dabei um spezielle Puffer, Taq-Polymerase und deoxy-Ribonukleotide.

Kurzbeschreibung der Abbildungen:

Abbildungen 1 und 2 zeigen eine Schmelzkurvenanalyse gemäß Beispiel 2. Dargestellt ist jeweils die erste Ableitung der gemessenen Fluoreszenz in Abhängigkeit von der jeweiligen Temperatur, gemessen mit einem FRET-Paar aus Fluorescein und LC-RED-640 zum Nachweis von stxA1 (Abbildung 1) und einem FRET-Paar aus Fluorescein und LC-RED-705 zum Nachweis von stxA2 (Abbildung 2).

Beispiel 1: DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen und Stuhlproben

Bakterienkulturen wurden nach Übernachtskultur in TSB-Bouillon (Caseinpepton, pankreatisch verdaut 17,0 g/l; Sojamehlpepton, papainisch verdaut 3,0 g/l; Natriumchlorid 5,0 g/l; Dikaliumhydrogenphosphat 2,5 g/l; Glucose 2,5 g/l.) mit Hilfe eines kommerziellen DNA-Extraktionsverfahrens (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Katalog Nr. 51304) aufgearbeitet. Dazu wurden 200 µl der Bakteriensuspension mit 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer ATL für 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden der Suspension 200 µl 96 % Ethanol zugemischt. Die Lösung wurde dann auf eine QIAamp Spin-Säule gegeben und für 1 min mit 6000 g abzentrifugiert. Danach wurden die Säulen einmal mit je 500 µl Puffer AW1 und AW2 gewaschen (Tischzentrifuge 20000 g). Nach dem zweiten Waschschritt wurde die Säule einmal trockenzentrifugiert. Die Elution der gereinigten DNA erfolgte im Anschluß daran mit 200 µl Puffer AE (10 mM Tris/HCC 0,5 mM EDTA pH 9,0). Vor der Verwendung in einer PCR-Reaktion wurden DNA-Konzentration und Reinheit in einem Photometer bestimmt (Spektrum von 260 nm bis 320 nm). Je PCR-Ansatz wurden maximal 500 ng Template-DNA eingesetzt. Bei Backgrounduntersuchungen wurde ein DNA-Äquivalent zu 10^7 Bakterien (entspricht ca 55 ng DNA) eingesetzt.

Mit einem speziellen Stuhlkit (QIAamp DNA Stool Kit, enthaltend die gleichen Puffer wie der QIAamp DNA Mini Kit) wurden PCR-Untersuchungen direkt aus Stuhlproben durchgeführt. Dazu wurden 200 mg Stuhl (200 µl bei Durchfallstühlen) mit 600 µl Puffer ASL gründlich vermischt. Parallel dazu werden 300 mg der Matrix AX (Adsorbens für Inhibitoren in Stuhlproben) in 900 µl des gleichen Puffers resuspendiert. Diese Suspension wurde dann zu der gelösten Stuhlprobe gegeben und gründlich durchmischt. Anschließend wurde das Homogenat für 5 min bei 70°C inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt von 3 min mit 20000 g wurden dann die Matrix AX und nicht gelöste Stuhlpartikel pelletiert. 200 µl des Überstandes wurden danach, analog zum o. g. QIAamp DNA Mini Protokoll mit 20 µl Proteinase K versetzt und, ebenso für 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA ganz analog zu der Vorgehensweise für Bakterienkulturen, unter Verwendung der gleichen Puffer an eine QIAamp Spin-Säule gebunden, gewaschen, eluiert und im Photometer ausgemessen. Bei der anschließenden PCR-Reaktion wurden die gleichen DNA-Mengen, wie oben beschrieben, eingesetzt.

Beispiel 2: Amplifikation und Identifizierung der Amplifikationsprodukte

Eine Multiplex-PCR zum Nachweis von stxA1 bzw stxA2 in DNA isoliert nach einem der Verfahren aus Beispiel 1 wurde im LightCycler System (Roche Molecular Biochemicals) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Nachweis des Amplifikationsproduktes erfolgte nach zwei unterschiedlichen Protokollen entweder mithilfe von SybrGreen als doppelsträngige DNA bindendes Agens oder alternativ mithilfe von FRET-Hybridisations-Sonden.

Sämtliche verwendeten Primer und Hybridisations-Sonden waren HPLC-gereinigt und wurden in Stocklösungen von 100 pM/μl (Primer) bzw. 3 pM/μl (Sonden) aufbewahrt. Die eingesetzten Primer wurden dabei so ausgewählt, daß von stxA1 ein 418 bp-Fragment (Nukleotidposition 598- 1015, Primer gemäß SEQ ID NO 1 und 2) und von stxA2 ein 264 bp-Fragment (Nukleotidposition 679-942, Primer gemäß SEQ ID NO 3 und 4) amplifiziert werden konnte.

Die zur Detektion eingesetzten Hybridisations-Sonden wurden nach Standardprotokollen markiert. Zum Nachweis von stxA1 wurde ein Oligonukleotid gemäß SEQ ID NO 5 mit Fluorescein am 3' Ende markiert und ein Oligonukleotid gemäß SEQ ID NO 6 am 5' Ende markiert. Als Hybridisations-Sonden für den Nachweis von stxA2 wurde ein Oligonukleotid gemäß SEQ ID NO 7 mit Fluorescein am 3' Ende und ein Oligonukleotid gemäß SEQ ID NO 8 mit LC-RED-705 am 5' Ende markiert.

Nachweis mit SybrGreen:

2,0 μl DNA-Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals, enthaltend
Puffer, Taq DNA Polymerase, dNTPs, MgCl₂, und SYBR Green I Farbstoff)
10 pM je eingesetztem Primer gemäß SEQ ID NO 1-4
2,4 μl 25 mM MgCl₂ (Arbeitskonzentration 4 mM)
10 μl DNA
20 μl Gesamtansatz

Nachweis mit Hybridisations-Sonden:

2,0 µl DNA-Master for Hybridization Probes (Roche Molecular Biochemicals, enthaltend Puffer, Taq polymerase, dNTPs, and MgCl₂)
10 pM je eingesetztem Primer gemäß SEQ ID NO 1-4
3 pM je eingesetzter Hybridisations-Sonde gemäß SEQ ID NO 5 und 6 für stxA1 der SEQ ID NO 7 und 8 stxA2
2,4 µl 25 mM MgCl₂ (Endkonzentration 4 mM)
8,0 µl DNA
20 µl Gesamtansatz

Beide Ansätze wurden mit dem gleichen PCR-Programm gefahren und mit einer Schmelzkurve abgeschlossen:

Temperaturzyklen:

95°C 120 sec Denaturierung zu Beginn des Programms
95°C 1 sec
55°C 5 sec (Touchdown von 60°C bis 55°C in 5 Schritten zu 1°C)
72°C 20 sec
45 Zyklen

Die Schmelzkurven wurden nach vorheriger kurzzeitiger Denaturierung bei 95°C in einem Intervall von 50°C bis 95°C in 0,2°C-Schritten mit kontinuierlicher Fluoreszenzmessung auf Kanal 1 (SYBR Green), Kanal 2 (LC-Red 640) oder Kanal 3 (LC-Red 705) mithilfe der LightCycler Software 3.0 erstellt.

Im SYBR Green Modus wurde die Spezifität von PCR-Produkten aus Stuhlproben über den Schmelzpunkt im Vergleich zu einer Kontrolle aus stx-positiven Bakterien ermittelt, insbesondere um das Amplifikationsprodukt von unspezifischen Primer-Dimeren unterscheiden zu können. Darüber hinaus wurden alle Ergebnisse durch Gelelektrophorese verifiziert.

Im Falle des FRET-Hybridisations-Sonden-Formates war es erforderlich, den Color Compensation File der LightCycler 3.0 Software zur Vermeidung von Crosstalk-Effekten

zwischen Kanal 2 und 3 einzusetzen. Die Ergebnisse eines typischen Experiments sind in Abbildung 1 und 2 offenbart:

Abbildung 1 zeigt die Temperatur-Abhängigkeit der Fluoreszenz aus Ansätzen mit unterschiedlichen DNA-Ausgangs-Konzentrationen in Kanal 2 (LC-RED-640) zum Nachweis von stxA1; Abbildung 2 zeigt die Fluoreszenz der gleichen Proben, gemessen in Kanal 3 (LC-RED-705) zum Nachweis von stxA2. Dargestellt ist jeweils die erste Ableitung des gemäß den Angaben des LightCycler-Herstellers gemessenen Fluoreszenzwertes in Abhängigkeit von der jeweiligen Schmelzkurventemperatur. Dadurch entsprechen die Temperaturwerte der ermittelten Kurven-Maxima den Schmelzpunkten der jeweiligen Hybridisations-Sonden.

Beispiel 3: Sensitivität

DNA des stx1 und stx2- positiven E.coli-Stamms EDL 933 wurde gemäß Beispiel 1 extrahiert und photometrisch quantifiziert. Ausgehend von der Annahme, daß 2×10^8 Bakterien ca. $1 \mu\text{g}$ DNA enthalten, wurde auf die Anzahl der aufgearbeiteten Bakterien rückgeschlossen und Verdünnungsreihen erstellt. Als Background wurden angezüchtete Stuhlproben aus der Routinediagnostik, die frei von darmpathogenen Erreger waren, mit der oben beschriebenen Methode bearbeitet. In Multiplex-Anätzen gemäß Beispiel 2 konnten dabei in einem Reaktionsansatz Äquivalente von mindestens ca. 1,8 stx-positiven Bakterien in einem Background von ca. 1×10^7 stx-defizienten Bakterien nachgewiesen werden.

Beispiel 4: Spezifität – Nachweis von Human- und Schweine-pathogenen EHEC

48 humane Isolate unterschiedlichen Serotyps, deren Genotyp zum Zeitpunkt der Erfindung nicht bekannt war, die aber bereits durch andere Methoden nach dem Stand der Technik als EHEC-Stämme charakterisiert worden waren, wurden gemäß Beispiel 2 im FRET-Hybridisationssonden-Modus untersucht. Zusätzlich wurden 3 Isolate aus E.coli-Ödem-erkrankten Schweinen untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 1 dargestellt:

Tabelle 1: Nachweis von Human- und Schweine-pathogenem stx

Laufende-Nr.	Code-Nr.	Herkunft	Serotyp	stx ₁	stx ₂	T _m stxA ₂
1	485/98	KI	O145:H ⁻	+	-	-
2	531/98	KI	O145:H ⁻	+	-	-
3	563/98	KI	O113:HNT	+	-	-
4	633/98	KI	O26:H ⁻	-	+	72°C
5	741/98	KI	O121:H ⁻	-	+	72°C
6	742/98	KI	O8:H ⁻	-	+	63°C
7	768/98	KI	O30:H21	-	+	72°C
8	802/98	KI	O157:H ⁻	-	+	72°C
9	1115/98	KI	O157:H ⁻	+	+	72°C
10	1168/98	KI	O128:H ⁻	+	+	63°C
11	1211/98	KI	O60:H ⁻	-	+	63°C
12	1244/98	KI	O6:H8	-	+	72°C
13	1273/98	KI	O6:H8	-	+	72°C
14	1295/98	KI	ONT:H ⁻	-	+	72°C
15	1306/98	KI	O157:H ⁻	+	+	72°C
16	1568/98	KI	O103:H ⁻	+	-	-
17	1613/98	KI	ONT:HNT	+	-	-
18	1695/98	KI	O103:H ⁻	+	-	-
19	1760/98	KI	O129:H ⁻	+	+	63°C
20	1762/98	KI	O129:H ⁻	+	+	63°C
21	1771/98	KI	O113:H2	+	+	63°C
22	54/99	KI	O103:H18	+	-	-
23	90/99	KI	O157:H ⁻	-	+	72°C
24	109/99	KI	O157:H ⁻	-	+	72°C
25	143/99	KI	O92:H32	-	+	63°C
26	144/99	KI	O92:H32	-	+	63°C
27	159/99	KI	O76:H ⁻	+	+	63°C
28	197/99	KI	O128:HNT	+	+	63°C
29	209/99	KI	ONT:HNT	-	+	72°C
30	240/99	KI	O30:HNT	-	+	72°C
31	285/99	KI	O145:HNT	+	-	-

**Fortsetzung Tabelle 1: Nachweis von Human- und Schweine-
pathogenem stx**

Laufende-Nr.	Code-Nr.	Herkunft	Serotyp	stx ₁	stx ₂	T _m stxA ₂
32	363/99	KI	ONT:H ⁻	+	+	63°C
33	497/99	KI	O103:H4	+	-	-
34	516/99	KI	ONT:H ⁻	+	-	-
35	575/99	KI	O157:H ⁻	-	+	72°C
36	576/99	KI	O157:H ⁻	-	+	72°C
37	594/99	KI	ONT:H ⁻	+	-	-
38	649/99	KI	ONT:H9	-	+	72°C
39	680/99	KI	O157:H ⁻	+	+	72°C
40	707/99	KI	ONT:HNT	+	+	63°C
41	713/99	KI	O115:H10	+	-	-
42	720/99	KI	O111:H ⁻	+	-	-
43	789/99	KI	O103:HNT	+	-	-
44	791/99	KI	O91:HNT	+	-	-
45	809/99	KI	ONT:HNT	+	-	-
46	826/99	KI	ONT:HNT	+	-	-
47	827/99	KI	ONT:HNT	-	+	72°C
48	834/99	KI	ONT:HNT	+	-	-
49	A 3473-1/98	OeK	O139:H1	-	+	63°C
50	A 3621-2/98	OeK	O139:H1	-	+	63°C
51	82812/99	OeK	O139:H1	-	+	63°C

KI = klinisches Isolat

OeK = Ödemkrankheit

Dabei konnten sämtliche humanen Isolate als stx positiv identifiziert werden, wobei in 18 Stämmen lediglich stx1, in 19 Stämmen lediglich stx2 und in 11 Stämmen beide Gene nachgewiesen wurden. Die drei Schweine-Isolate waren ebenfalls stx2-positiv.

Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Hybridisierungsproben gemäß SEQ ID NO 7 und 8 wurden bei verschiedenen Isolaten Unterschiede hinsichtlich der Schmelztemperaturen von stxA2 gemessen: Bei Amplifikaten aus 18 der 30 stxA2 enthaltenden humanen Isolate wurden für stxA2 Schmelztemperaturen von 71-72°C ermittelt. Diese Temperatur ist identisch mit dem aufgrund vorangegangener Experimente ermittelten T_m für klonierte stxA2 DNA aus Human-pathogenen Stämmen. Für die DNA der restlichen 12 stxA2 enthaltenden humanen Isolate sowie für die DNA aus den drei Schweine-pathogenen Stämmen, welche mit Sicherheit das stx_{2e} Allel enthalten, wurden Schmelztemperaturen von ca. 63°C ermittelt. Aus dem identischen T_m kann gefolgert werden, daß die 12 Human-pathogenen Isolate auf Schweine-pathogene EHEC Stämme zurückzuführen sind und vermutlich ebenfalls das stx_{2e} Allel enthalten. Diese Vermutung wurde durch Sequenzanalyse der PCR-Produkte aus den entsprechenden 12 Isolaten bestätigt.

Insgesamt zeigt dieses Beispiel, dass mithilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens sowohl Human-pathogene als auch Schweine-pathogene EHEC Erreger identifiziert werden können.

Beispiel 5: Spezifität – Vermeidung falsch positiver Ergebnisse

Spezifitätstests wurden an 32 in Tabelle 1 aufgelisteten stx-negativen Bakterienstämmen durchgeführt. Dazu wurde aus entsprechenden Übernachtskulturen DNA gemäß Beispiel 1 extrahiert. Anschließend wurde die isolierte DNA gemäß Beispiel 2 mithilfe des SybrGreen Modus auf die Präsenz von stxA1 und stxA2 untersucht. Das Ergebnis war immer eindeutig negativ. Als Inhibitionskontrolle wurde die DNA in einem parallelen Ansatz mit DNA des stx1 - und stx2 - positiven E. coli - Stammes EDL 933 vermischt und im gleichen Lauf auf stx1 und stx2 getestet, wobei ohne Ausnahme eindeutig positive Signale erhalten wurden.

Tabelle 2: Im Spezifitätstest ausgetestete Bakterienisolate

<i>Aeromonas hydrophilia</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051
<i>Campylobacter coli</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Campylobacter jejuni</i>	ATCC 33560
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231 Typ 3
<i>Citrobacter freundii</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Enterobacter cloacae</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 10541
<i>Enterococcus faecalis</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434
<i>Enterococcus faecium</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
EAEC O – 42	KLINISCHES ISOLAT
EIEC 460858	KLINISCHES ISOLAT
EPEC E 2348/69	KLINISCHES ISOLAT
ETEC	KLINISCHES ISOLAT
<i>Helicobacter pylori</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 10031
<i>Morganella morganii</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 1453
<i>Proteus vulgaris</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Pasteurella canis</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Salmonella enteritidis</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Salmonella typhimurium</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Shigella flexneri</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Staphylococcus aureus</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Streptococcus agalactiae</i>	KLINISCHES ISOLAT
<i>Yersinia enterocolitica</i>	KLINISCHES ISOLAT

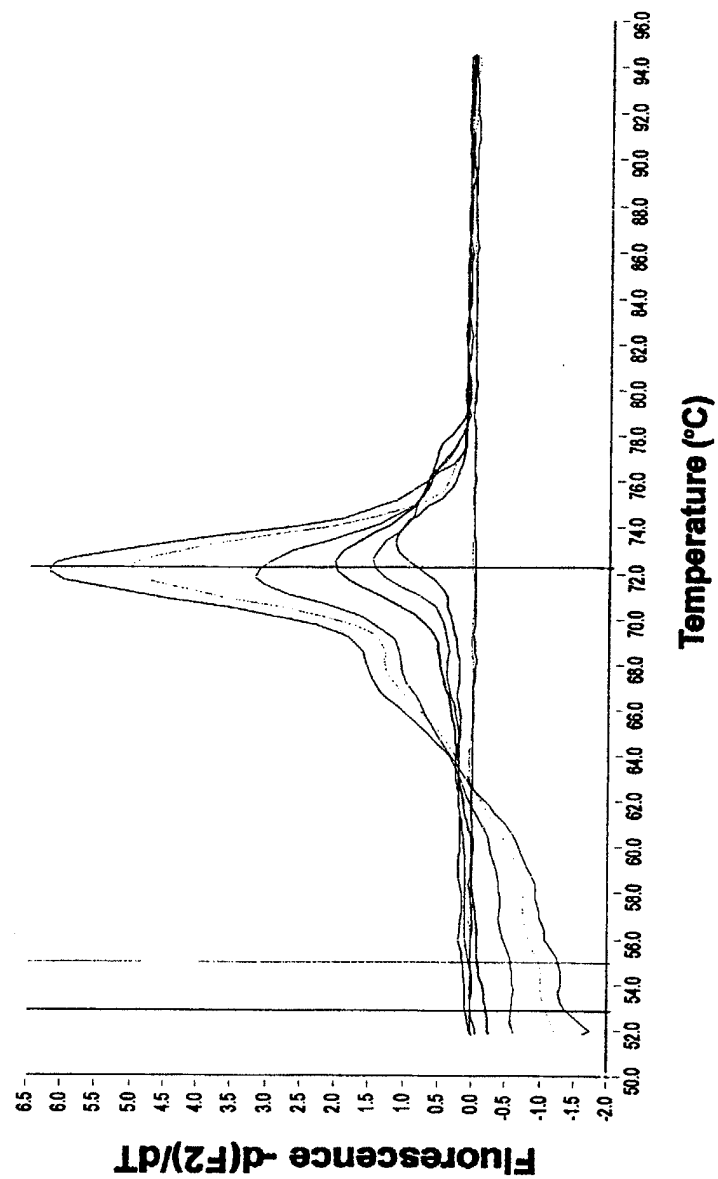
Somit zeigt dieses Beispiel, daß das erfindungsgemäße Verfahren zur spezifischen Detektion von EHEC Infektionen geeignet ist.

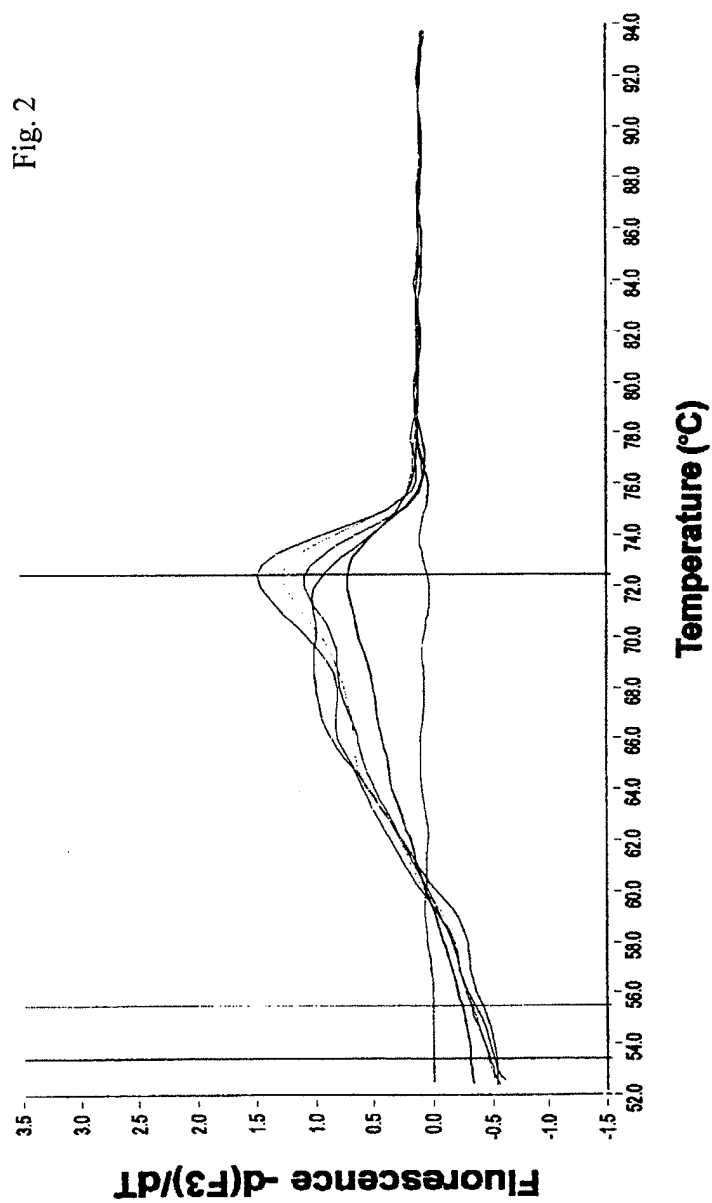
Ansprüche

1. Primer einer Länge von 17 bis 25 Nukleotiden, deren Sequenzen identisch mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 sind, oder deren Sequenzen Teilsequenzen einer der Sequenzen gemäß SEQ ID NO 1-4 darstellen, oder bei denen eine Sequenz gemäß SEQ ID NO 1-4 eine kontinuierliche Teilsequenz des Primers bildet.
2. Multiplex Amplifikationsreaktion zum Nachweis von klinisch relevanten EHEC-Infektionen, bei der sowohl stxA1 als auch stxA2 Sequenzen sowohl Human-pathogener als auch Schweine-pathogener stx2 Isoformen amplifiziert werden, dadurch gekennzeichnet, daß ein, mehrere oder alle Primer gemäß Anspruch 1 verwendet werden.
3. Verwendung von Primern gemäß Anspruch 1 zum Nachweis einer EHEC Infektion.
4. Verfahren gemäß Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Produkt der Amplifikationsreaktion zusätzlich durch Hybridisierung detektiert wird.
5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine Hybridisations-Sonde eine Sequenz aufweist, die identisch oder komplementär zu der Region des stxA1 Gens bzw. des stxA2 Gens ist, die für das enzymatisch aktive Zentrum der kodierten Polypeptidkette kodiert.
6. Verfahren gemäß Anspruch 2-5, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsprodukt mithilfe von Fluoreszenzdetektion nachgewiesen wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsprodukt mithilfe einer bei Bindung an doppelsträngige DNA fluoreszierenden Verbindung detektiert wird.
8. Verfahren gemäß Anspruch 4-6, dadurch gekennzeichnet, daß das Amplifikationsprodukt mithilfe von Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer nachgewiesen wird.

9. Verfahren gemäß Anspruch 8, bei dem ein interner Standard eingesetzt wird, welcher sich von der stxA1 oder der stxA2 Sequenz nur in ein oder zwei Punktmutationen unterscheidet, dadurch gekennzeichnet, daß amplifizierte Target-DNA und interner Standard mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse voneinander unterschieden werden.
10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, das Human-pathogenes stxA2 und Schweine-pathogenes stxA2_e mithilfe einer Schmelzkurvenanalyse unterschieden werden.
11. Hybridisations-Sonden mit Sequenzen oder Teilsequenzen gemäß SEQ ID NO 5-8.
12. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß Hybridisations-Sonden mit Sequenzen gemäß Anspruch 11 verwendet werden.
13. Verwendung von Hybridisations-Sonden gemäß Anspruch 11 zur Bestimmung von Schmelzkurven.
14. Kit zum Nachweis klinisch relevanter EHEC-Infektionen, enthaltend Primer gemäß Anspruch 1.
15. Kit gemäß Anspruch 14 enthaltend Hybridisations-Sonden.
16. Kit gemäß Anspruch 14 oder 15, enthaltend Reagenzien zur Amplifikation zusätzlicher Pathogenitätsfaktoren.

Fig. 1





SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH

<120> Multiplex-PCR zum Nachweis von EHEC-Infektionen

<130> 529800de

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 1

agtcgtacgg ggatgcagat aaat

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 2

ccggacacat agaaggaaac tcat

24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

ttccggaatg caaatcagtc

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 4

cgataactccg gaagcacatt g

21

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 5

ctgtcacagt aacaaaccgt aacatcgctc

30

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 6

tgccacagac tgcgtcagtg aggt

24

<210> 7
<211> 28
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 7
agagcagttc tgcgttttgt cactgtca

28

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 8
agcagaagcc ttacgcttca ggc

23